



Implication des protéines IRP (Iron Regulatory Protein) dans le métabolisme du fer chez les animaux

Xavier Brazzolotto

► To cite this version:

Xavier Brazzolotto. Implication des protéines IRP (Iron Regulatory Protein) dans le métabolisme du fer chez les animaux. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2001. Français. NNT: . tel-00193675

HAL Id: tel-00193675

<https://theses.hal.science/tel-00193675>

Submitted on 4 Dec 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE 1
SCIENCES & GEOGRAPHIE

THESE

pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : **BIOLOGIE**

présentée et soutenue publiquement

par

Xavier BRAZZOLOTTO

Le 14 novembre 2001

IMPLICATION DES PROTEINES IRP
(*Iron Regulatory Protein*) DANS LE METABOLISME
DU FER CHEZ LES ANIMAUX

Directeur de thèse : Dr Jean-Marc MOULIS

JURY

Mme.	Isabelle MOREL	rapporteur
M.	Jean-Claude DRAPIER	rapporteur
M.	Alain FAVIER	examineur
M.	Jean-Louis PIERRE	examineur
M.	Jean-Marc MOULIS	examineur

I <u>INTRODUCTION</u>	p I-1
I-A <u>L'acquisition et le transport du fer</u>	p I-3
I-A-1 <u>L'absorption du fer</u>	p I-3
I-A-1-a <u>Absorption intestinale</u>	p I-3
I-A-1-b <u>Le passage dans la circulation</u>	p I-5
I-A-2 <u>Le fer circulant</u>	p I-6
I-A-3 <u>L'acquisition du fer par les cellules</u>	p I-6
I-A-3-a <u>Le récepteur de la transferrine et HFE</u>	p I-6
I-A-3-b <u>Autres mécanismes d'acquisition</u>	p I-7
I-B <u>L'utilisation intracellulaire du fer</u>	p I-8
I-B-1 <u>Les hémoprotéines</u>	p I-8
I-B-2 <u>Les protéines fer-soufre</u>	p I-8
I-B-3 <u>Autres protéines à fer</u>	p I-10
I-B-3-a <u>La ferritine</u>	p I-10
I-B-3-b <u>La transferrine</u>	p I-11
I-C <u>La dualité du fer</u>	p I-12
I-D <u>Le système IRP/IRE</u>	p I-13
I-D-1 <u>Le motif IRE (<i>Iron responsive Element</i>)</u>	p I-13
I-D-1-a <u>IRE en position 5'</u>	p I-13
I-D-1-b <u>IRE en position 3'</u>	p I-15
I-D-1-c <u>Structure du motif IRE</u>	p I-15
I-D-1-d <u>Mode d'action</u>	p I-15
I-D-1-d-i <u>IRE en position 5'</u>	p I-16
I-D-1-d-ii <u>IRE en position 3'</u>	p I-16
I-D-1-d-iii <u>Mutations d'IRE</u>	p I-16

I-D-2 <u>Les IRP (<i>Iron Regulatory Protein</i>)</u>	p I-17
I-D-2-a <u>Généralités sur IRP1</u>	p I-17
I-D-2-b <u>Généralités sur IRP2</u>	p I-19
I-D-3 <u>La régulation par le fer</u>	p I-20
I-D-4 <u>Mise en évidence des différents sites actifs de IRP1</u>	p I-20
I-D-4-a <u>Résidus impliqués dans l'activité aconitase</u>	p I-20
I-D-4-b <u>Résidus impliqués dans la fixation du motif IRE</u>	p I-21
I-D-4-c <u>Localisation des sites actifs</u>	p I-21
I-D-5 <u>Mécanismes de régulation mis en jeu</u>	p I-23
I-D-5-a <u>IRP2</u>	p I-23
I-D-5-b <u>IRP1</u>	p I-23
I-D-5-b-i <u>Le démantèlement du centre fer-soufre</u>	p I-23
I-D-5-b-ii <u>L'assemblage du centre fer-soufre</u>	p xI-24
I-E <u>Objectifs du travail de thèse</u>	p I-25
 <u>II PRODUCTION, PURIFICATION ET CARACTERISATION DE</u>	
<u>rhIRP1</u>	p II-1
II-A <u>Résultats</u>	p II-3
II-A-1 <u>Expression</u>	p II-3
II-A-2 <u>Purification</u>	p II-6
II-A-3 <u>Caractérisation du produit purifié</u>	p II-7
II-A-4 <u>Analyse de la protéine rhIRP1 par spectrométrie de masse (ESI-MS)</u>	p II-15
II-A-4-a <u>Théorie de la spectrométrie de masse ESI-MS</u>	p II-15
II-A-4-a-i <u>Phénomène d'électro-nébulisation</u>	p II-15
II-A-4-a-ii <u>Analyse</u>	p II-15
II-A-4-b <u>Résultats</u>	p II-17
II-B <u>Conclusion</u>	p II-21

III <u>REACTIVITE DE rhIRP1</u>	p III-1
III-A <u>REACTIVITE D'IRP1 VIS A VIS DES ESPECES OXYDANTES</u>	p III-2
III-A-1 <u>Etude avec l'oxygène moléculaire</u>	p III-2
III-A-2 <u>Etude avec l'ion superoxyde</u>	p III-4
III-A-2-a <u>Résultats</u>	p III-5
III-A-2-b <u>Discussion</u>	p III-7
III-A-3 <u>Etude avec le peroxyde d'hydrogène</u>	p III-9
III-A-3-a <u>Résultats</u>	p III-10
III-A-3-a-i <u>Evolution de l'activité aconitase</u>	p III-10
III-A-3-a-ii <u>Evolution de l'activité de fixation au motif IRE</u>	p III-11
III-A-3-a-iii <u>Evolution du centre fer-soufre de la protéine</u>	p III-14
<u>Spectroscopie UV-Visible</u>	p III-14
<u>Spectroscopie RPE</u>	p III-15
<u>Apparition de fer chélatable</u>	p III-15
<u>Chélation par la ferrozine</u>	p III-17
<u>Chélation par la desferrioxamine</u>	p III-17
III-A-3-a-iv <u>Implication du radical hydroxyle dans l'inactivation</u> <u>de rhIRP1</u>	p III-21
<u>Piégeage des radicaux dérivés de H₂O₂</u>	p III-21
<u>Réaction du radical hydroxyle avec rhIRP1</u>	p III-26
III-A-3-a-v <u>Etat redox du fer libéré</u>	p III-29
III-A-3-a-vi <u>Réactivation de la forme générée par le peroxyde</u> <u>d'hydrogène</u>	p III-30
III-A-3-b <u>Discussion</u>	p III-30
III-A-4 <u>Etude de l'oxygène singulet</u>	p III-34
III-A-4-a <u>Résultats</u>	p III-35
III-A-4-a-i <u>Effet sur l'activité aconitase de rhIRP1</u>	p III-35
III-A-4-a-ii <u>Effet sur l'activité de fixation au motif IRE</u> <u>de rhIRP1</u>	p III-38
III-A-4-b <u>Discussion</u>	p III-40

III-B <u>EFFET DE LA DOXORUBICINE</u>	p III-41
III-B-1 <u>Résultats</u>	p III-45
III-B-1-a <u>Effet de la résistance à la doxorubicine</u>	p III-45
III-B-1-b <u>Effet <i>in vivo</i> de la doxorubicine sur l'état des IRP</u>	p III-48
III-B-1-c <u>Effet de la doxorubicine sur les extraits cellulaires</u>	p III-50
III-B-1-d <u>Synthèse du doxorubicinol</u>	p III-52
III-B-1-e <u>Effet de la doxorubicine et du doxorubicinol sur la protéine</u> <u>recombinante IRP1</u>	p III-54
III-B-1-e-i <u>Effet sur l'activité aconitase de rhIRP1</u>	p III-54
III-B-1-e-ii <u>Effet sur l'activité de fixation au motif IRE</u> <u>de rhIRP1</u>	p III-54
III-B-1-e-iii <u>Etudes spectroscopiques UV-visible et RPE</u>	p III-57
III-B-2 <u>Discussion</u>	p III-59
III-C <u>REACTIVITE DE IRP1 VIS A VIS DE THIOLS</u>	p III-62
III-C-1 <u>Résultats</u>	p III-63
III-C-1-a <u>Effet du 2ME</u>	p III-63
III-C-1-b <u>Effet d'autres thiols</u>	p III-63
III-C-1-c <u>Rôle protecteur du substrat</u>	p III-66
III-C-1-d <u>Rôle de l'IRE</u>	p III-68
III-C-1-e <u>Rôle de la quantité de protéine</u>	p III-68
III-C-1-f <u>Rôle du caractère réducteur du 2ME</u>	p III-70
III-C-1-g <u>Effet solvant du 2ME</u>	p III-73
III-C-2 <u>Discussion</u>	p III-75
 <u>IV RECHERCHE DE PROTEINES INTERAGISSANT AVEC LA</u> <u>PROTEINE IRP1 PAR LA TECHNIQUE DU DOUBLE HYBRIDE DANS</u> <u>LA LEVURE</u>	p IV-1
IV-A <u>Principe du système double hybride</u>	p IV-2

IV-B <u>Résultats</u>	p IV-5
IV-B-1 <u>Construction pLex-T1</u>	p IV-5
IV-B-2 <u>Résultats de l'étude double hybride à l'aide de la construction pLex-T1</u> ...	p IV-7
IV-B-3 <u>Construction pLex-F1</u>	p IV-8
IV-B-4 <u>Résultats de l'étude double hybride à l'aide de la construction pLex-F1</u> ...	p IV-8
IV-C <u>Discussion</u>	p IV-17
IV-D <u>Conclusion</u>	p IV-19

V DOSAGE DE L'ACTIVITE DE FIXATION AU MOTIF IRE PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE..... p V-1

V-A <u>L'électrophorèse capillaire</u>	p V-1
V-B <u>Choix du fluorophore</u>	p V-3
V-C <u>Résultats</u>	p V-6
V-C-1 <u>Modification chimique de la sonde IRE</u>	p V-6
V-C-2 <u>Propriétés Spectroscopiques de la sonde Oregon-IRE</u>	p V-8
V-C-3 <u>Capacité de reconnaissance de la sonde Oregon-IRE par les IRP</u>	p V-11
V-C-4 <u>Dosages CEMSA (<i>Capillary Electrophoresis Mobility Shift Assay</i>)</u>	p V-12
V-D <u>Conclusion</u>	p V-19

VI ETUDE STRUCTURALE DE LA PROTEINE rhIRP1.....p VI-1

VI-A <u>Génération de la forme fixatrice du motif IRE de rhIRP1</u>	p VI-2
VI-B <u>Etude par Diffusion de Neutrons</u>	p VI-4

VI-B-1	<u>Théorie de la diffusion des neutrons</u>	p VI-4
VI-B-2	<u>Résultats</u>	p VI-11
VI-B-2-a	<u>Forme aconitase de rhIRP1</u>	p VI-11
VI-B-2-b	<u>Forme fixatrice du motif IRE de rhIRP1</u>	p VI-13
VI-B-2-c	<u>Forme fixant le motif IRE de rhIRP1</u>	p VI-15
VI-C	<u>Etude par Dichroïsme Circulaire</u>	p VI-17
VI-C-1	<u>Théorie</u>	p VI-17
VI-C-2	<u>Résultats</u>	p VI-19
VI-C-2-a	<u>Forme aconitase de IRP1</u>	p VI-19
VI-C-2-b	<u>Forme fixatrice du motif IRE</u>	p VI-21
VI-C-2-c	<u>Comparaison de la forme aconitase et de la forme fixatrice du</u> <u>Motif IRE de rhIRP1</u>	p VI-21
VI-C-2-d	<u>Etude de la fixation du motif IRE</u>	p VI-21
VI-C-2-d-i	<u>Motif IRE</u>	p VI-22
VI-C-2-d-ii	<u>Forme de rhIRP1 fixant le motif IRE</u>	p VI-22
VI-D	<u>Discussion</u>	p VI-25
VII	<u>CONCLUSION GENERALE</u>	p VII-1
VIII	<u>MATERIELS ET METHODES</u>	p VIII-1
VIII-A	<u>Matériel Biologique</u>	p VIII-1
VIII-A-1	<u>Souches Procaryotes</u>	p VIII-1
VIII-A-2	<u>Souches Eucaryotes</u>	p VIII-1
VIII-A-3	<u>Plasmides</u>	p VIII-2
VIII-B	<u>Tampons et milieux</u>	p VIII-6

VIII-B-1 <u>Tampons</u>	p VIII-6
VIII-B-2 <u>Milieux</u>	p VIII-7
VIII-C <u>Méthodes générales de biologie moléculaire</u>	p VIII-9
VIII-C-1 <u>PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)</u>	p VIII-9
VIII-C-2 <u>Digestion par les endonucléases de restriction</u>	p VIII-13
VIII-C-3 <u>Analyse et purification des fragments oligonucléotidiques sur gel d'agarose</u>	p VIII-13
VIII-C-4 <u>Extraction de l'ADN(ARN) par une solution de Phénol / Chloroforme / Alcool Isomalylique</u>	p VIII-15
VIII-C-5 <u>Purification de l'ADN(ARN) par précipitation à l'éthanol</u>	p VIII-15
VIII-C-6 <u>Déphosphorylation par traitement aux phosphatases</u>	p VIII-15
VIII-C-7 <u>Ligaturation</u>	p VIII-16
VIII-C-8 <u>Transformation des cellules d'<i>Eschérichia coli</i> (DH5α et K38/pGP1-2)</u>	p VIII-16
VIII-C-8-a <u>Préparation de cellules compétentes</u>	p VIII-16
VIII-C-8-b <u>Transformation</u>	p VIII-17
VIII-C-9 <u>Purification de plasmide</u>	p VIII-17
VIII-D <u>Méthodes biochimiques générales</u>	p VIII-17
VIII-D-1 <u>Dosage de la concentration des protéines</u>	p VIII-17
VIII-D-2 <u>Dosage de la concentration d'ADN(ARN)</u>	p VIII-18
VIII-D-3 <u>Analyse des protéines sur gel dénaturant de polyacrylamide</u>	p VIII-18
VIII-D-4 <u>Transfert sur membrane</u>	p VIII-19
VIII-D-5 <u>Préparation des extraits cytosoliques des cellules eucaryotes K562/GLC4</u>	p VIII-19
VIII-E <u>Production et purification de rhIRP1</u>	p VIII-20
VIII-E-1 <u>Clonage de la protéine IRP1</u>	p VIII-20
VIII-E-2 <u>Production de rhIRP1</u>	p VIII-20

VIII-E-3	<u>Protocole de purification de rhIRP1</u>	p VIII-22
VIII-E-3-a	<u>Précipitation au sulfate d'ammonium</u>	p VIII-22
VIII-E-3-b	<u>Chromatographie d'échange d'ions (CM52 / DE52)</u>	p VIII-22
VIII-E-3-c	<u>Chromatographie d'interactions hydrophobes</u>	p VIII-23
VIII-E-3-d	<u>Chromatographie par filtration sur gel</u>	p VIII-23
VIII-E-3-e	<u>Chromatographie liquide moyenne pression d'interactions hydrophobes</u>	p VIII-23
VIII-E-3-f	<u>Chromatographie sur résine d'hydroxyapatite</u>	p VIII-24
VIII-E-3-g	<u>Chromatographie liquide haute performance d'échange d'anions</u>	p VIII-24
VIII-E-4	<u>Génération de la forme fixatrice du motif IRE de la protéine rhIRP1</u>	p VIII-27
VIII-F	<u>Méthodes propres à l'étude de IRP1</u>	p VIII-27
VIII-F-1	<u>Dosage de l'activité aconitase d'une solution</u>	p VIII-27
VIII-F-2	<u>Modification du plasmide codant pour le motif IRE</u>	p VIII-27
VIII-F-3	<u>Préparation de la matrice pour la synthèse du motif IRE</u>	p VIII-28
VIII-F-4	<u>Synthèse de la sonde IRE en présence de traceur radioactif</u>	p VIII-29
VIII-F-4-a	<u>Transcription <i>in vitro</i></u>	p VIII-29
VIII-F-4-b	<u>Purification sur gel dénaturant de polyacrylamide</u>	p VIII-29
VIII-F-5	<u>Dosage de l'activité de fixation du motif IRE</u>	p VIII-30
VIII-F-6	<u>Synthèse de la sonde IRE sans marquage radioactif</u>	p VIII-30
VIII-G	<u>Mise en œuvre des expérience 'double-hydride' dans la levure</u>	p VIII-31
VIII-G-1	<u>Préparation de la première construction (pLEX-T1)</u>	p VIII-31
VIII-G-2	<u>Préparation de la seconde construction (pLEX-F1)</u>	p VIII-31
VIII-G-3	<u>Titration de la banque de cDNA de cerveau humain</u>	p VIII-32
VIII-G-4	<u>Amplification de la banque de cDNA de cerveau humain</u>	p VIII-32
VIII-G-5	<u>Purification des plasmides dérivés de pGAD de la banque d'ADNc de cerveau humain</u>	p VIII-33
VIII-G-6	<u>Transformation des levures</u>	p VIII-33
VIII-G-6-a	<u>Préparation des levures compétentes</u>	p VIII-33
VIII-G-6-b	<u>Transformation</u>	p VIII-34

VIII-G-7	<u>Préparation des extraits cytosoliques de levure</u>	p VIII-34
VIII-G-8	<u>Détection de la protéine de fusion LexA-T1</u>	p VIII-35
VIII-G-8-a	<u>Immunodétection</u>	p VIII-35
VIII-G-9	<u>Dosage de l'activité β-galactosidase avec le X-Gal</u>	p VIII-35
VIII-G-10	<u>Purification des plasmides de levures</u>	p VIII-36
VIII-G-11	<u>Transformation d'<i>Escherichia coli</i> HB101</u>	p VIII-37
VIII-G-11-a	<u>Préparation des bactéries</u>	p VIII-37
VIII-G-11-b	<u>Transformation par électroporation</u>	p VIII-37
VIII-G-12	<u>Purification des plasmides de HB101</u>	p VIII-38
VIII-H	<u>Expériences liées aux séparations par Electrophorèse Capillaire</u>	p VIII-38
VIII-H-1	<u>Modification de la sonde</u>	p VIII-38
VIII-H-2	<u>Séparation par électrophorèse capillaire</u>	p VIII-39
VIII-I	<u>Méthodes structurales</u>	p VIII-39
VIII-I-1	<u>Préparation des échantillons de diffusion des neutrons</u>	p VIII-39
VIII-I-2	<u>Diffusion des neutrons</u>	p VIII-40
VIII-I-3	<u>Dichroïsme circulaire</u>	p VIII-40
VIII-J	<u>Autres Matériels et Méthodes</u>	p VIII-41
VIII-J-1	<u>Spectroscopie UV-Visible</u>	p VIII-41
VIII-J-2	<u>Spectroscopie de fluorescence</u>	p VIII-41
VIII-J-3	<u>Spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE)</u>	p VIII-41
VIII-J-4	<u>Spectrométrie de masse</u>	p VIII-41
VIII-J-4-a	<u>Préparation des échantillons</u>	p VIII-41
VIII-J-4-b	<u>Conditions d'acquisition des données</u>	p VIII-41
VIII-J-5	<u>Synthèse de doxorubicinol</u>	p VIII-42
IX	<u>REFERENCES BOBLIOGRAPHIQUES</u>	p IX-1

ABREVIATIONS

- 2ME : 2-mercaptoéthanol
- Amp : Ampiciline
- CD : *Circular Dichroism*
- DEPC : Diethyl-pyrocarbonate
- DEPMPO : 5-(Diéthoxyphosphoryl)-5-méthyl-1-pyrroline N-Oxide
- DHPN : N,N'-di(2,3-dihydroxypropyl)-1,4-naphthalenedipropanamide
- DHPNO₂ : endoperoxyde du DHPN
- DMSO : Diméthyl-sulfoxyde
- DTT : Dithiothreitol
- EDAC : [1-(3-Diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide]
- EDTA : Acide Ethylenediaminetetraacétique
- ESI-MS : (*Electrospray Ionization Mass Spectrometry*)
- EtOH : Ethanol
- Ft : Ferritine
- HEPES : acide N-[2-hydroxyéthyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonique]
- HO : Hème-Oxygénase
- IRE : *Iron Responsive Element*
- IRP : *Iron Regulatory Protein*
- PCR : *Polymerase Chain Reaction*
- rhIRP1 : Protéine IRP1 recombinante humaine
- RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
- RPE : Résonance Paramagnétique Electronique
- SDS : *Sodium Dodecyl Sulfate*
- Str : Streptomycine
- Tf : Transferrine
- TfR : Récepteur de la transferrine
- Tris : Tris(hydroxyméthyl)aminométhane

LISTE DES FIGURES

- Figure I-1	p I-2
- Figure I-2	p I-4
- Figure I-3	p I-9
- Figure I-4	p I-10
- Figure I-5	p I-14
- Figure I-6	p I-18
- Figure I-7	p I-22
- Figure II-1	p II-4
- Figure II-2	p II-5
- Figure II-3	p II-8
- Tableau II-1	p II-9
- Figure II-4	p II-11
- Figure II-5	p II-13
- Figure II-6	p II-14
- Figure II-7	p II-18
- Tableau II-2	p II-18
- Figure III-1	p III-3

INTRODUCTION

Le Fer est l'un des éléments les plus abondants, représentant près de 5% de la croûte terrestre sous différentes formes minérales. C'est un métal de transition, de formule électronique $[\text{Ar}] 3d^6 4s^2$, dans laquelle la couche incomplète 3d lui confère des propriétés d'accepteur ou de donneur d'électron.

Dans les milieux aqueux, constituant l'essentiel des milieux biologiques, il se présente majoritairement sous deux formes ioniques : l'état ferreux Fe^{2+} ($3d^6 4s^0$) et l'état ferrique Fe^{3+} ($3d^5 4s^0$).

Mais dans l'atmosphère terrestre largement oxygénée, le fer se trouve majoritairement sous sa forme oxydée, ferrique. Or le fer ferrique est très peu soluble dans les milieux aqueux, avec une constante de dissociation de l'ordre de 10^{-18} M à pH neutre. Il en résulte que les différentes espèces vivantes ont développé différentes stratégies d'acquisition de ce métal.

En effet, et malgré cette contrainte de solubilité, ce métal est à l'origine des propriétés particulières de nombreuses protéines et enzymes, de part son abondance et ses caractéristiques physico-chimiques (transfert d'un électron et acide de Lewis). Il en résulte que le fer est indispensable pour la survie de la quasi totalité des organismes vivants, à l'exception de quelques bactéries du genre *Lactobacillus* où il est fonctionnellement remplacé par d'autres métaux de transition, essentiellement le manganèse et le cobalt.

L'homme ne déroge pas à cette règle et chez l'adulte, la quantité totale de fer, de 4 à 5 grammes, est répartie entre deux grands ensembles (Figure I-1).

- Le premier correspond au fer utilisé dans les différents processus métaboliques et représente la majorité du fer de l'organisme. Le métal est présent au site actif de diverses protéines et enzymes et, d'un point de vue quantitatif, il se trouve majoritairement dans l'hémoglobine et la myoglobine.

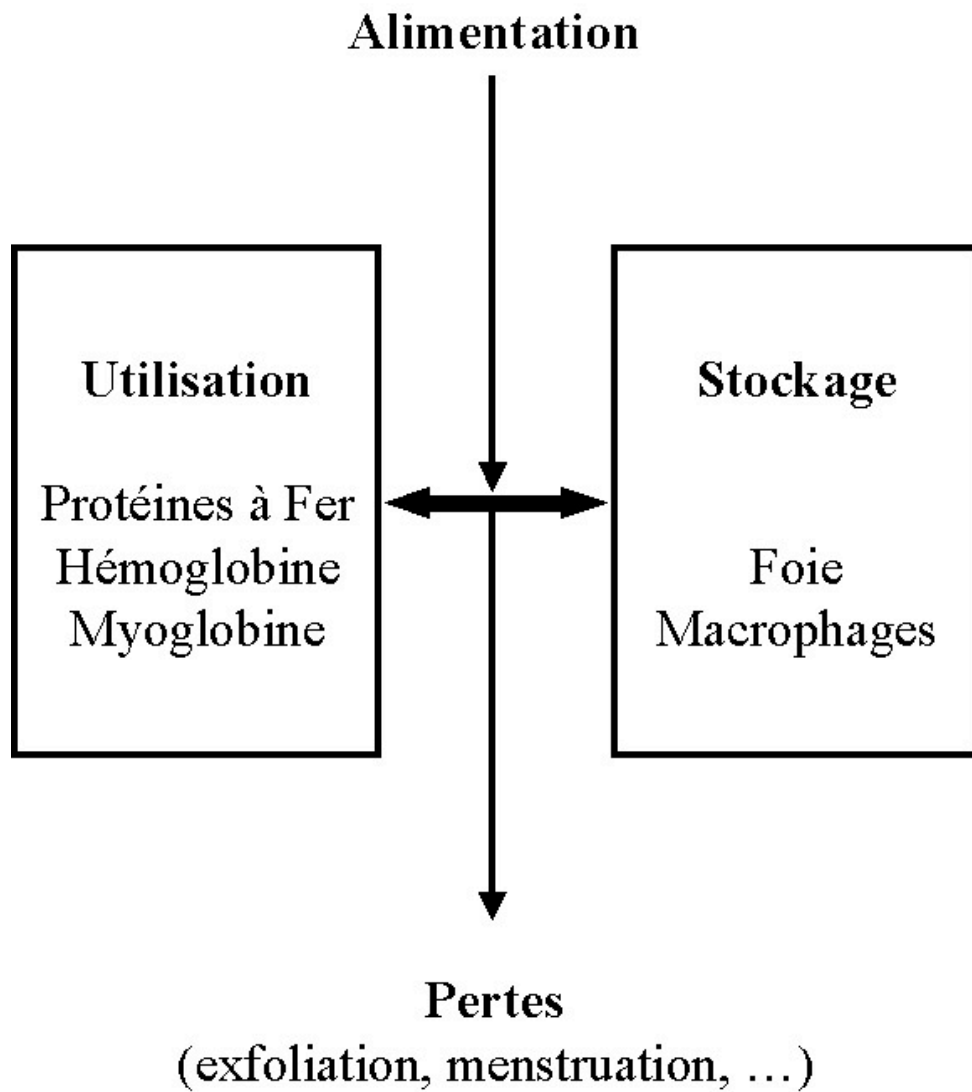


Figure I-1 : Schéma des flux internes du fer chez l'homme.

- Le second ensemble correspond au fer stocké dans l'organisme. Cette quantité est très variable suivant les individus ; elle est en moyenne de l'ordre du gramme et se trouve essentiellement dans le foie avec des quantités significatives aussi dans les macrophages.

Ce fer n'est pas statique mais il est recyclé entre ces deux grands ensembles et la quantité assurant les échanges, le fer circulant, ne représente qu'une très faible proportion de la quantité totale, de l'ordre de 3 milligrammes.

Enfin, les pertes moyennes quotidiennes, de l'ordre du milligramme, qui s'effectuent par des processus non spécifiques, comme l'exfoliation des cellules mortes, ou lors de la menstruation chez les femmes, doivent être compensées par l'apport alimentaire (Figure I-1).

I-A L'acquisition et le transport du fer

Chez les procaryotes, l'acquisition de fer s'effectue majoritairement via des transporteurs membranaires, dont certains sont spécifiques pour des composés à haut pouvoir de chélation synthétisés par les microorganismes, les sidérophores (Braun et Killmann 1999). Chez l'eucaryote *Saccharomyces cerevisiae*, d'autres transporteurs spécifiques ont été caractérisés (Askwith *et coll.* 1996, Eide 1998). Mais nous nous intéresserons plus particulièrement ici aux eucaryotes supérieurs tels que les mammifères.

I-A-1 L'absorption du fer

I-A-1-a Absorption intestinale

L'étape d'acquisition du fer à partir du bol alimentaire s'effectue essentiellement dans la partie supérieure de l'intestin, le duodénum, par des cellules épithéliales différenciées, les entérocytes, situées au sommet de structures plissées nommées villosités. Ces cellules expriment spécifiquement à leur surface apicale, une isoforme de la protéine DCT1 (nommée aussi Nramp2 ou DMT1) (Gunshin *et coll.* 1997, Fleming *et coll.* 1997) (Figure I-2) découverte par expression différentielle entre animaux carencés et animaux contrôles et reconstitution du transport dans des oocytes de *Xénope*. Il existe aussi des animaux modèles,

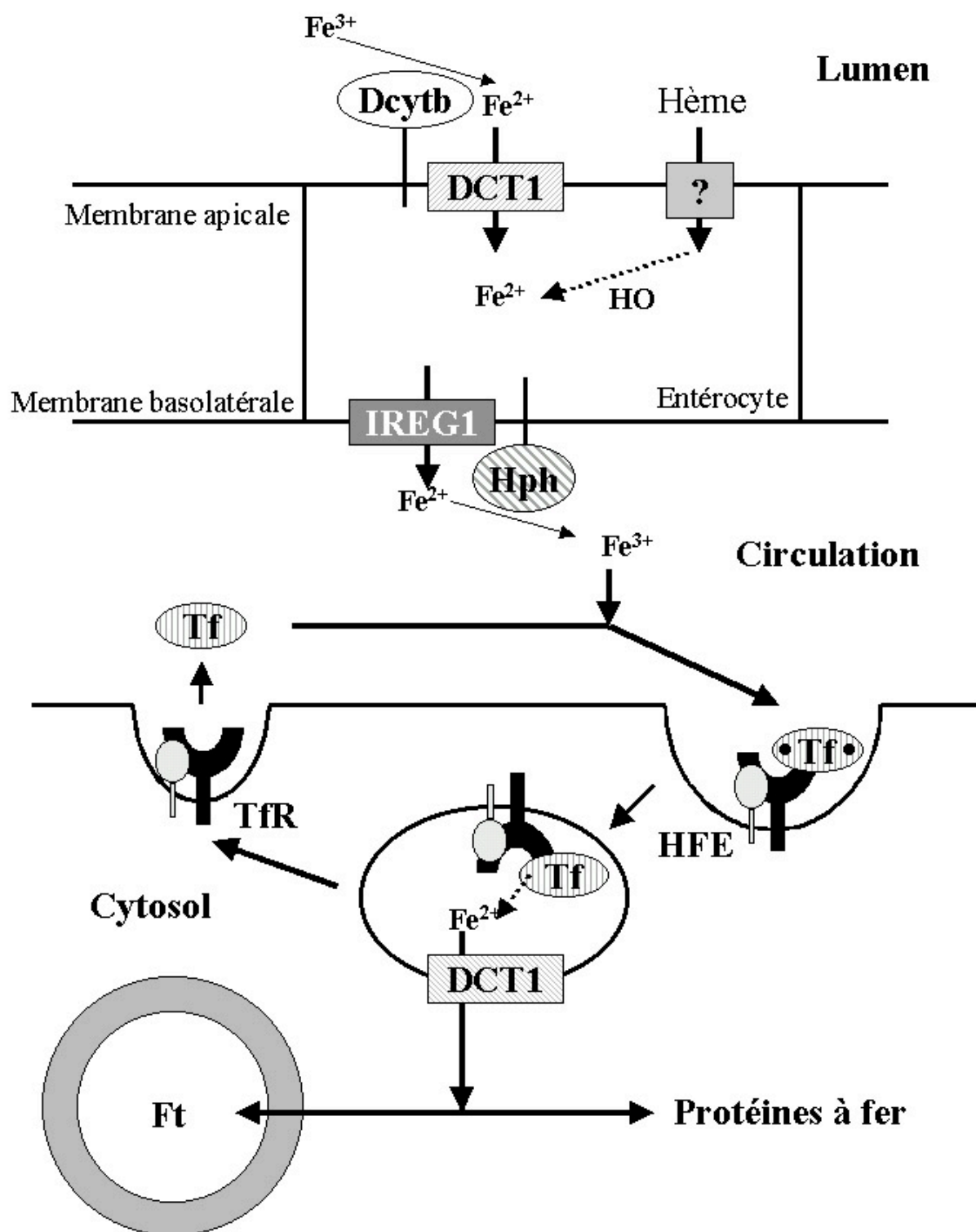


Figure I-2 : Représentation schématique de l'acquisition et du transport du fer chez les mammifères.

Ft : ferritine; Hph : héphaestine; Tf : transferrine, TfR : récepteur de la transferrine, HO : Hème-oxygénase.

fortement anémiés, dont le gène de DCT1 est déficient, les souris *mk* et les rats *Belgrade*. Cette isoforme est spécifique aux entérocytes et sa synthèse est induite lors de la différenciation qui s'effectue quand la cellule migre de la crypte vers le sommet de la villosité. Cette protéine membranaire joue le rôle d'un transporteur de cations métalliques divalents associé à un synport de protons (Andrews 1999).

Néanmoins, comme le fer présent dans le bol alimentaire est ferrique et comme DCT1 ne transporte que les cations divalents, une activité ferriréductase est nécessaire à la surface apicale des entérocytes. L'enzyme responsable de cette activité ferriréductase a récemment été découverte chez la souris (*Dcytb*) (McKie *et coll.* 2001) (Figure I-2).

Cependant, les mutations sur la protéine DCT1 observées dans les souris *mk* et les rats *Belgrade* n'étant pas létales, d'autres systèmes d'acquisition existent et notamment un transport actif du fer disponible sous sa forme hémnique (Figure I-2).

I-A-1-b Le passage dans la circulation

Une fois absorbé, le fer doit être distribué dans tout l'organisme et pour cela doit rejoindre la circulation sanguine en traversant la membrane basolatérale des entérocytes. Au niveau de cette membrane, une protéine, la ferroportine (ou IREG1 ou MTP1) (Donovan *et coll.* 2000, McKie *et coll.* 2000, Abboud et Haile 2000) assure ce transport (Figure I-2). Tout comme DCT1, cette protéine transporte spécifiquement le fer dans son état ferreux. Or une fois dans la circulation, c'est sous sa forme ferrique qu'il est ensuite pris en charge par la transferrine.

Une activité ferroxidase est donc nécessaire à ce niveau, pour permettre l'oxydation du fer ferreux à la sortie des entérocytes. Un candidat dans ce rôle a récemment été découvert, l'héphaestine (Vulpe *et coll.* 1999). Cette protéine membranaire est spécifiquement exprimée à la surface basolatérale des entérocytes et, de par son homologie avec la céruloplasmine (Eisenstein 2000a), elle est supposée présenter une activité ferroxidase.

I-A-2 Le fer circulant

Une fois dans la circulation, le fer ainsi oxydé, est pris en charge par une famille de protéines dont le rôle majeur est de délivrer le fer aux différentes cellules (Figure I-2).

La transferrine est un monomère de 80 KDa provenant de la duplication d'un gène ancestral qui peut, à pH neutre, lier avec une très forte affinité ($K_d = 10^{-22}$ M) jusqu'à deux atomes de fer ferrique, chacun au niveau d'un domaine de la protéine, le lobe N et le lobe C (Beard *et coll.* 1996).

D'autres protéines homologues à la transferrine, comme la lactoferrine ou l'ovotransferrine, bien que capables de lier aussi le fer ferrique ne semblent pas jouer un rôle équivalent à celui de la transferrine dans l'acquisition du fer, mais, plus certainement, elles sont utilisées dans d'autres fonctions, comme celle d'agent anti-bactérien, par exemple en captant le fer nécessaire au développement de la majorité des micro-organismes (Ponka *et coll.* 1998).

I-A-3 L'acquisition du fer par les cellules

I-A-3-a Le récepteur de la transferrine et HFE

Le système d'acquisition du fer des cellules érythrocytaires (Figure I-2) est généralisable à la majeure partie des types cellulaires, mis à part les cellules réticuloendothéliales où l'acquisition du métal s'effectue majoritairement par phagocytose des hématies.

Ce système fait intervenir un homodimère membranaire, le récepteur de la transferrine (Figure I-2) (Beard *et coll.* 1996). Cet homodimère de 180 KDa présente, dans sa partie N-terminale intracellulaire, un motif YTRF pour l'adressage vers les puits d'endocytose et qui est indispensable au bon fonctionnement du système (Beard *et coll.* 1996). La protéine peut lier jusqu'à deux molécules de transferrine par interaction avec ses domaines C-terminaux, extracellulaires, les ecto-domaines, avec une affinité croissante selon l'état de charge en fer de la transferrine (apotransferrine < monoferrique < diferrique) (Beard *et coll.* 1996).

Une protéine membranaire homologue des protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, HFE (Feder *et coll.* 1996), est associée à la β_2 -microglobuline et forme un complexe avec l'ecto-domaine du récepteur de la transferrine (Lebrón *et coll.* 1999, Bennet *et coll.* 2000). En se fixant au voisinage du site de la transferrine, HFE module la capacité d'acquisition de fer du récepteur (Riedel *et coll.* 1999). La mutation du gène HFE, notamment la mutation conduisant au remplacement C282Y, provoque une maladie, l'hémochromatose héréditaire, qui se caractérise par une surcharge en fer, essentiellement hépatique, progressive au cours de la vie. L'hémochromatose héréditaire est la maladie génétique la plus fréquente dans les populations d'origine nord-européenne, avec jusqu'à 5 personnes sur 1000 homozygotes pour la mutation C282Y. La mutation C282Y empêche l'adressage de la protéine HFE au niveau de la membrane par l'absence d'interaction avec la protéine β_2 -microglobuline (Feder *et coll.* 1997). En cultures cellulaires, ceci se traduit par une plus forte endocytose de transferrine chargée et donc une plus forte accumulation de fer dans les cellules (Feeney et Worwood 2001).

Lors de l'endocytose, l'endosome est acidifié (pH 5.5) par des pompes à protons ATP dépendantes. A ce pH acide, la transferrine libère son fer ferrique. Le complexe apo-transferrine / récepteur de la transferrine est recyclé à la surface de la cellule et la molécule d'apo-transferrine est relarguée dans la circulation (Ponka *et coll.* 1998).

Le fer libéré dans l'endosome est exporté hors de celui-ci dans le cytosol via une seconde isoforme de DCT1, qui est exprimée de façon ubiquitaire et qui présente la même fonction de transport de cations divalents. Une étape de réduction de l'ion ferrique libéré de la transferrine est donc nécessaire, mais à ce jour encore non identifiée.

I-A-3-b Autres mécanismes d'acquisition

D'autres mécanismes d'acquisition du fer existent et notamment dans certains types cellulaires particuliers où le système récepteur de la transferrine / transferrine n'a pas de fonction majeure. En particulier, dans le système réticuloendothélial l'acquisition de fer s'effectue majoritairement par phagocytose des hématies: l'hémoglobine est dégradée et le fer est libéré des hèmes par diverses hème-oxygénases (Yoshida et Migita 2000).

I-B L'utilisation intracellulaire du fer

Le fer ainsi obtenu par les cellules est utilisé dans de nombreuses protéines aux activités diverses. La présence de ce métal détermine leur activité, que se soit dans des réactions de transfert d'électrons (de nombreuses protéines de la chaîne respiratoire), dans l'utilisation du fer comme acide de Lewis (par exemple l'aconitase mitochondriale) ou, plus simplement, dans un rôle plus structural de stabilisation de la chaîne polypeptidique (par exemple l'endonucléase NthI). Le fer peut être ainsi assemblé dans les chaînes polypeptidiques selon divers modes de ligation qui délimitent diverses familles de protéine à fer (Karlin 1993).

I-B-1 Les hémoprotéines

Dans ce type de protéines, le fer se trouve associé à un noyau porphyrinique (par exemple la porphyrine IX dans le cas de l'hémoglobine) et forme alors un hème (Figure I-3). Les sites de coordinence vacants du fer, axiaux, peuvent être en partie ou totalement comblés par des résidus de la chaîne polypeptidique. Dans cette famille de protéines on retrouve des protéines essentielles au développement de la vie telle que nous la connaissons aujourd'hui. Notamment l'hémoglobine qui est indispensable à l'acheminement de l'oxygène moléculaire dans les cellules, mais aussi divers cytochromes de la chaîne respiratoire.

I-B-2 Les protéines fer-soufre

Dans ce type de protéines, le fer est préférentiellement lié à un atome de soufre. Celui-ci peut être inorganique, sous sa forme S^{2-} , ou celui d'un résidu cystéine de la chaîne polypeptidique. Plus rarement, des résidus comme l'aspartate ou l'histidine peuvent remplacer la cystéine. Les différents types de protéines fer-soufre présentent des activités diverses et variées (transfert d'électron, métabolisme, régulation, etc...) et peuvent se classer selon la géométrie de l'agrégat rencontré (mononucléaire, $[2Fe-2S]$, $[3/4Fe-4S]$, ...) (Beinert *et coll.* 1997) (Figure I-3).

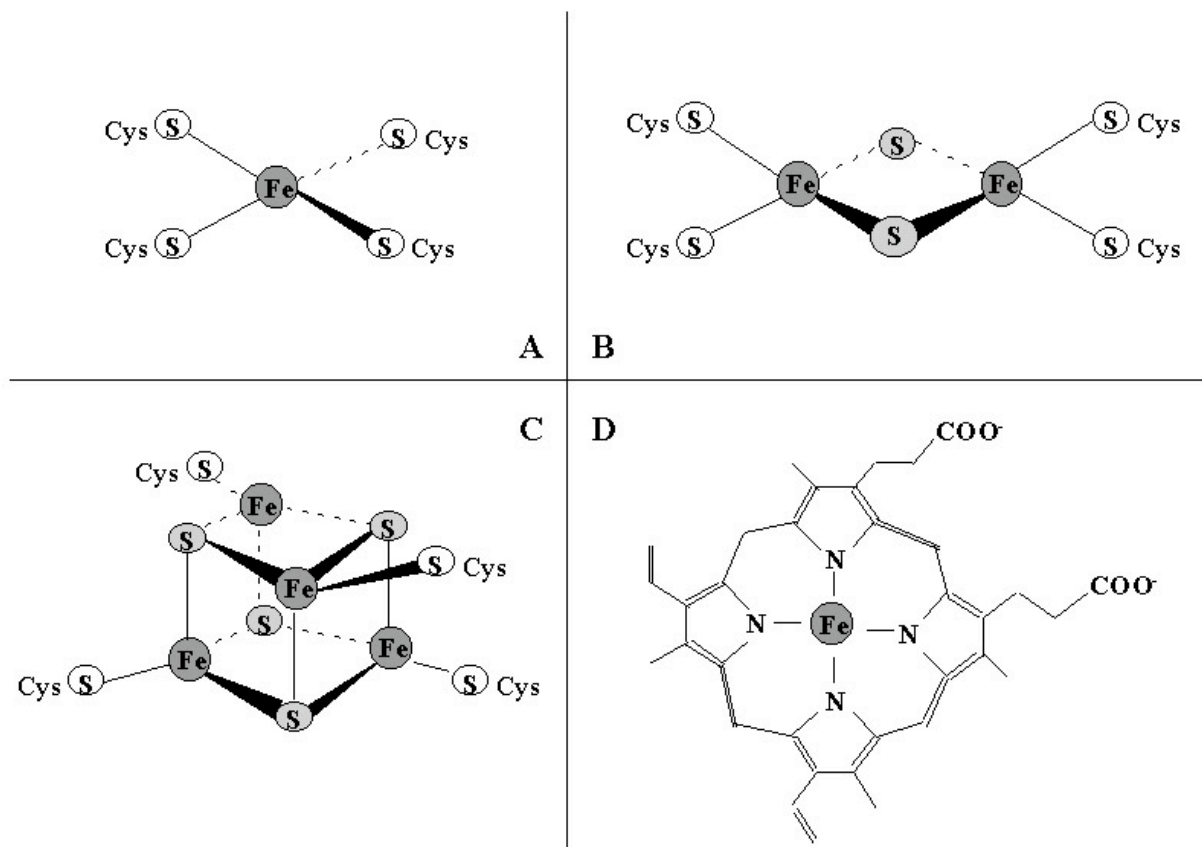


Figure I-3 : Exemples de modes de chélation du fer dans les protéines.

A : Mononucléaire à fer; B : centre [2Fe-2S]; C : centre [4Fe-4S];

D : Hème (protoporphyrine IX).

D'après Holm *et coll.* 1996

Un exemple, parmi d'autres, de géométrie d'un centre fer-soufre est celui rencontré dans l'aconitase mitochondriale (Beinert *et coll.* 1996). Dans cette protéine, l'agrégat de type [4Fe-4S], est inhabituel dans le sens où seulement 3 atomes de fer sont liés par 3 résidus cystéines (Fe_b). Le dernier fer (Fe_a), non lié à un résidu de la protéine, lie soit une molécule de solvant, soit une molécule de substrat. En effet, grâce à la présence de ce centre [4Fe-4S], la protéine possède une activité aconitase de transformation du citrate en iso-citrate, via la formation de l'intermédiaire *cis*-aconitate (Figure I-4).

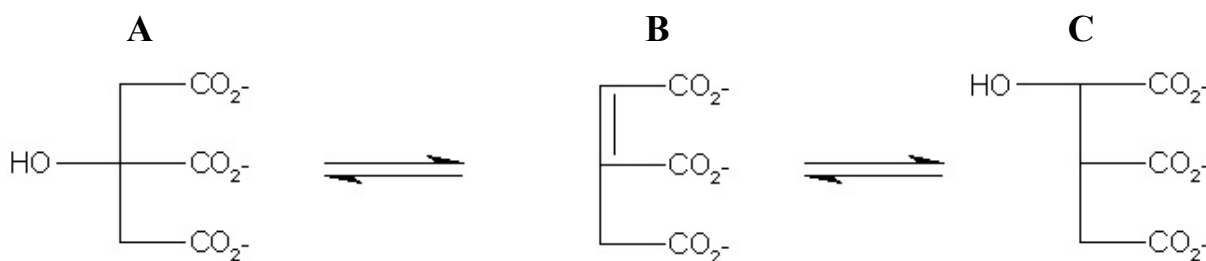


Figure I-4 : Réaction catalysée par l'activité aconitase.

A : Citrate ; B : *cis*-aconitate ; C : Iso-citrate.

I-B-3 Autres protéines à fer

Dans cette catégorie, entrent d'autres protéines aux activités diverses possédant un ou plusieurs atomes de fer, mais sous des modes de ligation différents de ceux décrits précédemment. Parmi cette catégorie, deux protéines jouent un rôle très important dans la bio-disponibilité du fer et sont présentées.

I-B-3-a La ferritine

La ferritine est un complexe multimérique (24-mère) formé de deux types de sous unités, les chaînes H et L, dont la fonction est de stocker le fer à l'intérieur des cellules sous une forme non réactive. Cette coque protéique, présentant une cavité interne de 80 Å de diamètre, peut accommoder, *in vitro*, jusqu'à 4500 atomes de fer sous une forme minérale analogue à un polymère de ferrhydrite (5Fe₂O₃-9H₂O) et contenant des atomes de phosphates (Ponka *et coll.* 1998).

- La chaîne H, pour *Heavy*, est une protéine de 22 KDa qui présente le site ferroxidase (Levi *et coll.* 1988, Lawson *et coll.* 1989) permettant l'oxydation du fer.
- La chaîne L, pour *Light*, est une protéine de 20 KDa qui présente le site de nucléation (Wagstaff *et coll.* 1978) pour la formation du cœur inorganique.

La proportion de chaque chaîne diffère selon les tissus. Ainsi, la ferritine est majoritairement H dans le cœur, alors que, dans le foie, elle est majoritairement L. Une hypothèse voudrait que ceci permette de moduler les propriétés de la ferritine selon les besoins en fer des tissus en favorisant, soit le stockage (chaîne L), soit l'échange (chaîne H) (Harrison et Arosio 1996).

Les structures de plusieurs formes de ferritine ont été déterminées (Tripathi *et coll.* 1995, Harrison *et coll.* 1998) et l'entrée et la sortie du fer sont supposées s'effectuer au niveau de canaux de 3 à 4 Å de diamètre situés le long des axes de symétries: 6 axes d'ordre 4, hydrophobes, et 8 axes d'ordre 3, hydrophiles. Le site d'oxydation semble se trouver sur ces axes d'ordre 3 (Wardeska *et coll.* 1986).

I-B-3-b La transferrine

La transferrine est la molécule qui permet le transport de fer dans la circulation et c'est la source majeure de fer de la plupart des types cellulaires (I-A-2, I-A-3, Figure I-2). La protéine peut lier avec une très forte affinité, et selon le pH, un atome de fer ferrique dans chacun de ses lobes. La structure tridimensionnelle de la transferrine a été résolue (MacGillivray *et coll.* 1998) et a permis de caractériser ce site de fixation, où le fer est hexa-coordiné. Quatre ligands protéiques, 2 tyrosines, une histidine et un aspartate, ainsi qu'une molécule de carbonate bidentate sont les ligands du métal.

I-C La dualité du fer

A côté de son rôle indispensable, le fer est aussi toxique en présence d'oxygène. *In vivo*, certaines espèces réduites de l'oxygène sont générées et, notamment, le radical superoxyde qui est un sous produit des chaînes respiratoires ou de la NADPH oxydase des cellules impliquées dans la défense immunitaire (Babior 1999).

Ce radical, par dismutation, génère le peroxyde d'hydrogène qui lui-même peut réagir avec du fer ferreux et générer, par ce que l'on nomme la réaction de Fenton, du fer ferrique et une autre espèce réactive de l'oxygène, le radical hydroxyle (Equation I-1).



C'est notamment cette espèce radicalaire qui est très toxique. En effet, elle est très réactive et peut modifier les différents composants cellulaires : ADN, protéines, lipides, glucides ... Particulièrement, la réaction du radical hydroxyle avec l'ADN génère des mutations qui peuvent contribuer à l'apparition de cancers. Sa réaction avec les lipides peut engendrer une fragilisation des membranes ou participer aux phénomènes d'athérosclérose. La modification des protéines par oxydation est associée au vieillissement, mais aussi à de nombreuses maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Halliwell et Gutteridge 1999).

La quasi totalité des espèces vivantes se trouvent donc confrontée au dilemme suivant :

- Il leur est nécessaire d'acquérir suffisamment de fer pour subvenir à leur besoins vitaux. Aujourd'hui encore, l'anémie (le manque de fer) est l'un des premiers problèmes de santé publique dans le monde à cause de la malnutrition présente surtout dans les pays en voie de développement.
- Mais il leur faut éviter la trop forte accumulation de fer pour empêcher tout effet toxique.

Pour faire face à ce problème, des systèmes de régulation stricte existent. Ainsi, chez les procaryotes et chez certains eucaryotes, comme la levure *Saccharomyces cerevisiae* des

facteurs de transcription, comme la protéine Fur chez les bactéries, interviennent (Hantke 2001).

Chez l'homme, des modes de régulation s'opèrent aussi au niveau transcriptionnel, régulant ainsi les protéines comme la ferritine, la transferrine et son récepteur (Eisenstein 2000b). Néanmoins, le système de régulation le plus répandu de l'homéostasie du fer agit au niveau post-transcriptionnel (Klausner *et coll.* 1993, Hentze et Kühn 1996, Eisenstein 2000b). Ce système est spécifique des métazoaires mais pas de tous les eucaryotes en général puisque, par exemple, aucun système homologue n'a pu être découvert chez les plantes.

Ce système agit au niveau du cytosol des cellules sur certains ARN messagers, en régulant la synthèse de diverses protéines impliquées dans l'importation, le stockage ou bien l'utilisation du fer par les cellules.

I-D Le système IRP/IRE

I-D-1 Le motif IRE (*Iron responsive Element*)

Le *cis*-élément de ce mode de régulation est un motif structural d'ARN en tige boucle nommé IRE , pour *Iron Responsive Element* (Figure I-5), situé soit en 5', soit en 3', de la région traduite de certains ARN messagers.

I-D-1-a IRE en position 5'

Parmi les ARN messagers contenant un motif IRE en 5' de la région codante, les premiers à avoir été caractérisés furent ceux codant pour les différentes sous-unités de la protéine de stockage du fer dans la cellule, les chaînes H et L de la ferritine (Aziz et Munro 1987, Hentze *et coll.* 1987)

D'autres ARN messagers ont été rapportés depuis comme étant porteurs de motif IRE. Parmi ceux-ci on trouve l'aminolévulinate synthase des érythrocytes immatures (eALAS) (Cox *et coll.* 1991, Dandekar *et coll.* 1991). Dans ce type cellulaire, cette protéine catalyse l'étape limitante de la synthèse de la porphyrine IX et donc de la synthèse de l'hème. L'ARN messager codant pour l'aconitase mitochondriale, une protéine possédant un centre [4Fe-4S],

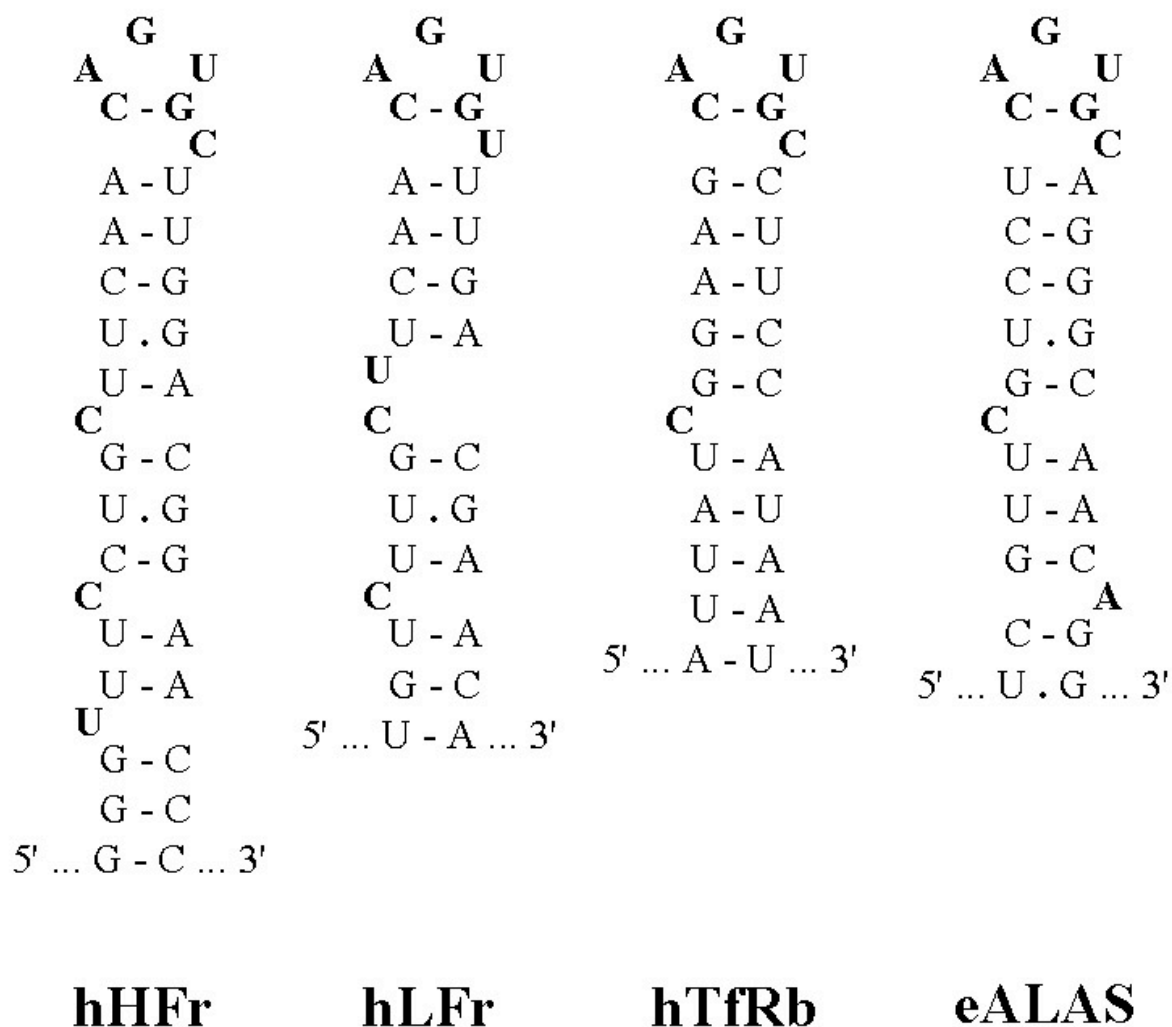


Figure I-5 : Représentation schématique de différents motifs IRE.

hHFr : chaîne H de la ferritine humaine; hLFr : chaîne L de la ferritine humaine;
hTfRb : isoforme b humaine du récepteur de la transferrine; eALAS : aminolévulinate
synthase des érythrocytes.

possède aussi un motif IRE en 5' de sa région codante (Zheng *et coll.* 1992). Chez la drosophile, un motif IRE positionnée en 5' de la région codante a été découvert dans l'ARN codant pour la sous-unité b de la succinate déshydrogénase, une autre protéine à centre fer-soufre (Kohler *et coll.* 1995). Enfin, plus récemment, un motif IRE a été découvert dans le messenger codant pour la protéine IREG1, la protéine responsable de la sortie du fer des entérocytes (I-A-1-b, McKie *et coll.* 2000).

I-D-1-b IRE en position 3'

Un groupe de 5 motifs IRE a aussi été caractérisé dans la partie 3' non codante des messagers des différentes isoformes du récepteur de la transferrine (Casey *et coll.* 1988), la protéine responsable de l'acquisition du fer dans la majeure partie des types cellulaires.

Plus récemment, un motif IRE a été identifié dans la partie 3' du messenger codant pour l'isoforme de DCT1, le transporteur de fer ferrique, exprimée spécifiquement à la surface apicale des entérocytes (I-A-1-a, Canonne-Hergaux *et coll.* 1999). Cette isoforme provient d'un épissage différentiel par lequel l'autre isoforme, exprimée de façon ubiquitaire, ne présente pas de motif IRE.

I-D-1-c Structure du motif IRE

D'un point de vue structural, les IRE sont caractérisées par une boucle de séquence CAGUGN très conservée et la présence d'une cytosine non appariée ('bulge' en anglais) située 5 bases en 5' de la boucle (Figure I-5). La structure d'une de ces IRE, l'IRE présente en 5' du messenger codant pour la chaîne H de la ferritine humaine, a été résolue par RMN (Address *et coll.* 1997). Ceci a permis de mettre en évidence l'appariement de la première base de la boucle, une cytosine, avec l'avant dernière base de cette même boucle, une guanine (Figure I-5).

I-D-1-d Mode d'action

Ces motifs IRE sont reconnus spécifiquement par des protéines cytosoliques nommées IRP pour *Iron Regulatory Protein* et l'interaction permet de réguler la traduction de l'ARN messenger selon la localisation du motif IRE.

I-D-1-d-i IRE en position 5'

Dans le cas où le motif IRE se situe en 5' de la région codante, la fixation de l'IRP inhibe la traduction du messenger. Le processus d'inhibition a été caractérisé. La fixation de l'IRP, par encombrement stérique, empêche la formation du complexe d'initiation et inhibe, donc, la synthèse de la protéine (Muckenthaler *et coll.* 1998).

Néanmoins, ce mécanisme, démontré dans le cas du messenger des différentes sous-unités de la ferritine, n'est pas généralisable à tous les ARN messagers possédant un motif IRE en 5' de la région codante. En effet dans le cas de IREG1, dans les conditions d'activité des IRP, la synthèse de protéine semble favorisée (McKie *et coll.* 2000) et non inhibée comme attendu par similitude avec le cas de la ferritine.

I-D-1-d-ii IRE en position 3'

A l'opposé, dans le cas du messenger du récepteur de la transferrine, la présence des 5 motifs IRE en position 3' de la région codante favorise la synthèse de protéine lors de la fixation des IRP. En effet cet ARN messenger est digéré par des endo-nucléases au niveau de son extrémité 3' ce qui limite sa demi-vie. Lors de la fixation des IRP sur les motifs IRE, le messenger est protégé de cette attaque nucléolytique. L'ARN est ainsi stabilisé, sa demi-vie augmente et une synthèse plus importante de protéine est possible.

Si le mode d'action décrit ci dessus pour le messenger du récepteur de la transferrine est parfaitement admis, le mode d'action vis à vis de l'IRE située dans la partie 3' du messenger codant l'isoforme de DCT1 est encore inconnu.

I-D-1-d-iii Mutations d'IRE

Diverses mutations sur l'IRE située en 5' de la chaîne L de la ferritine sont responsables d'une cataracte héréditaire due à une hyperferritinémie. L'accumulation de ferritine L conduit à une agrégation et à l'opacification du cristallin (Mikulits *et coll.* 1999).

I-D-2 Les IRP (*Iron Regulatory Protein*)

Les protéines reconnaissant les motifs IRE, les IRP, sont des protéines cytosoliques de la famille des isomérases à centres fer-soufre (Frishman et Hentze 1996). Une première IRP (IRP1) a été caractérisé en 1988 (Leibold et Munro 1988), puis, rapidement, un second représentant (IRP2) a été identifié (Cairo et Pietrangelo 1994, Guo *et coll.* 1994, Samaniego *et coll.* 1994).

La comparaison des structures primaires de ces protéines (Figure I-6) a rapidement montré que ces protéines sont des homologues de l'aconitase mitochondriale.

I-D-2-a Généralités sur IRP1

La protéine IRP1 est une protéine de 889 acides aminés, qui est présente dans la plupart des tissus. Cette protéine présente la caractéristique de pouvoir assembler un agrégat de type [4Fe-4S] (Haile *et coll.* 1992a). Sous cette forme, et grâce à la conservation de divers résidus par rapport à l'aconitase mitochondriale, la protéine présente une activité enzymatique similaire de transformation du citrate en isocitrate. Sous cette forme la protéine est communément dénommée aconitase cytosolique. L'agrégat, par analogie et par la conservation de cette activité, est supposé adopter une structure similaire à celui de l'homologue mitochondrial, caractérisée par 3 atomes de fer liés par 3 ligands cystéines, le quatrième atome de fer étant lié par une molécule de solvant ou de substrat (Lauble *et coll.* 1992).

L'utilité d'une telle activité aconitase dans le cytosol n'est pas très claire, néanmoins une possible implication dans une régulation du métabolisme énergétique ou une régulation de la concentration de citrate, une molécule capable de chélater le fer, sont des hypothèses possibles (Eisenstein 2000b).

La présence du centre métallique au sein de la protéine a pour conséquence la perte de la capacité de fixation de la protéine au motif IRE (Haile *et coll.* 1992a). En fait, la protéine intègre un tel centre fer-soufre lorsque la cellule dispose de fer. Dans le cas d'une carence en fer, la protéine perd son agrégat, par un mécanisme encore inconnu. Sous cette forme démétallée, la protéine peut fixer le motif IRE et réguler la traduction des ARN messagers

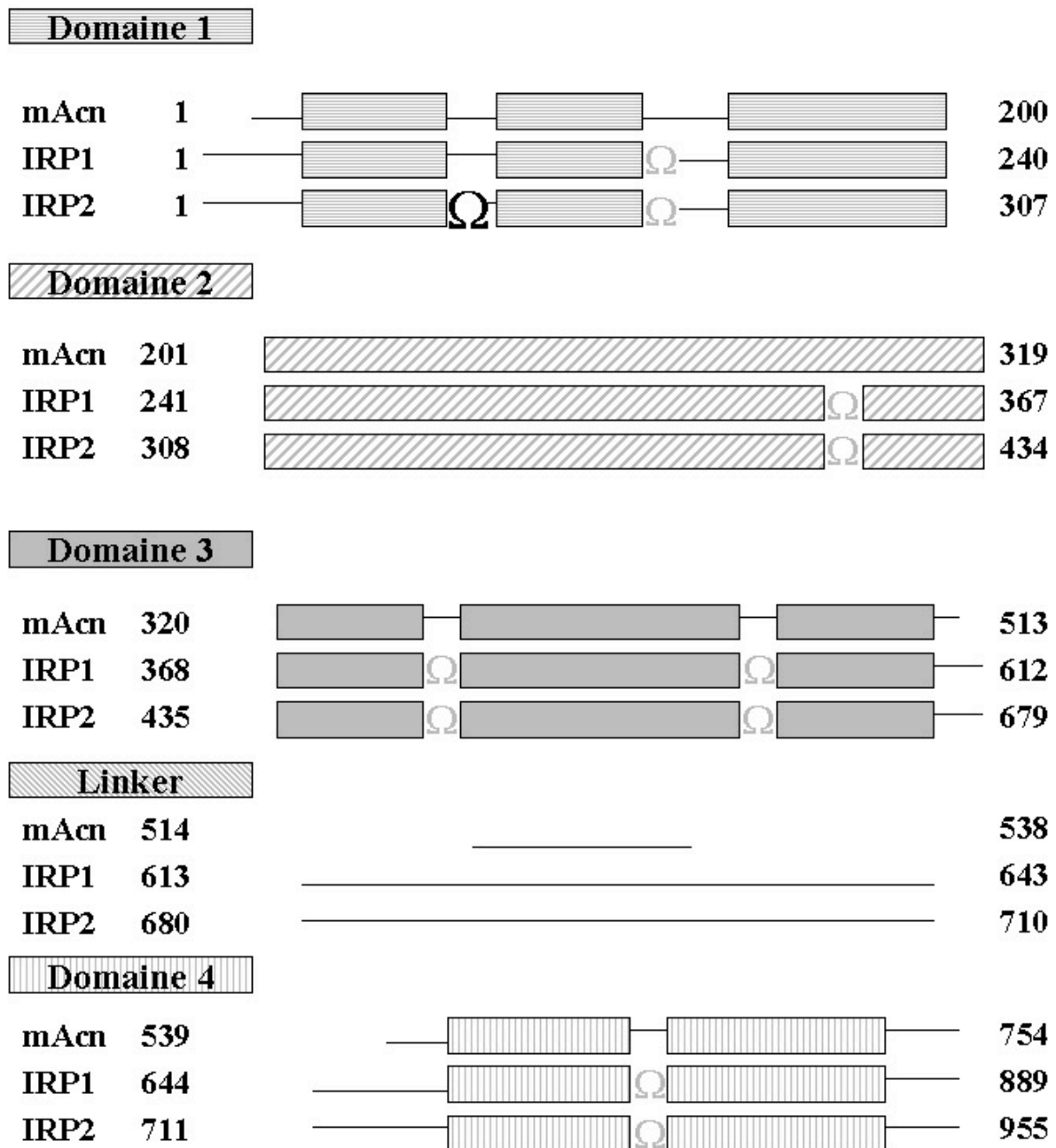


Figure I-6 : Représentation schématique de l'alignement de structure primaire entre les protéines humaines mAcn (aconitase mitochondriale), IRP1 et IRP2.

Les omegas représentent des insertions, l'omega noir correspond à l'insertion spécifique de 73 acides aminés dans IRP2.

D'après Frishman et Hentze 1996

(Haile *et coll.* 1992b). Puis quand la concentration intracellulaire en fer augmente, la protéine assemble un nouvel agrégat fer-soufre et perd ainsi toute affinité pour l'ARN. Ainsi, la protéine régule son activité par assemblage et désassemblage de son centre [4Fe-4S], sans qu'il y ait synthèse *de novo* de protéine (Pantopoulos *et coll.* 1995).

I-D-2-b Généralités sur IRP2

IRP2 est une protéine de 955 acides aminés, qui contrairement à IRP se trouve en général en faibles quantités dans les tissus. La différence majeure avec IRP1 concerne une insertion de 73 acides aminés, située dans la partie N-terminale (Figure I-6). Contrairement à IRP1, il n'a pas été possible de montrer que cette protéine peut assembler un centre fer-soufre, bien que les cystéines ligands de ce centre soient présentes. Ainsi, la protéine IRP2 ne présente pas d'activité aconitase.

Tout comme IRP1, IRP2 est régulée par la concentration intracellulaire de fer. Dans des conditions de carence en fer, la protéine fixe les motifs IRE et régule la traduction des ARN messagers. Néanmoins, des études de mutagenèse dirigée sur le motif IRE (Henderson *et coll.* 1996, Ke *et coll.* 1998) ont démontré que les IRE peuvent présenter des affinités différentes pour les deux IRP. Cette différence d'affinité pourrait faire intervenir un mode de régulation supplémentaire selon la spécificité des protéines impliquées (Theil et Eisenstein 2000).

Quand la concentration intracellulaire en fer devient suffisante, IRP2 ne fixe plus les motifs IRE. Cette perte d'activité de fixation de la protéine IRP2 a pu être associée à une diminution de la quantité de la protéine IRP2 dans la cellule (Guo *et coll.* 1995).

Des études de mutagenèse dirigée ont démontré que cette dégradation de la protéine IRP2 est due au fragment supplémentaire de 73 acides aminés. La délétion de cette insertion génère une protéine IRP2 non régulée par la concentration intracellulaire de fer (Iwai *et coll.* 1995). L'insertion de ce même peptide à une position semblable au sein de la protéine IRP1, confère à cette dernière un mécanisme de régulation semblable à celui de IRP2 par dégradation. La synthèse *de novo* de la protéine IRP2 est donc nécessaire pour retrouver l'état d'activité observé dans les situations de carence.

Récemment des études génétiques consistant à créer des souris homozygotes déficientes en protéine IRP2 (LaVaute *et coll* 2001) ont montré l'importance de la protéine IRP2 dans la régulation du métabolisme du fer. Ces souris présentent des problèmes d'absorption de fer et en accumulent de grandes quantités dans le cerveau responsables de troubles neurodégénératifs qui se caractérisent par des désordres du mouvement (tremblements, etc...) après quelques mois.

I-D-3 La régulation par le fer

Quand la concentration intracellulaire de fer est faible, c'est à dire quand la cellule est en carence de fer, les IRP sont actives. Il en résulte une activation des mécanismes d'acquisition de fer, comme la synthèse des récepteurs de la transferrine de IREG1 et de DCT1. Au contraire, le stockage du métal est inutile et la synthèse de ferritine est inhibée. L'utilisation du fer ne pouvant être optimale, certaines fonctions utilisant des protéines fer-soufre ou des hémoprotéines sont ralenties et la synthèse des protéines participant à ces fonctions (aconitase mitochondriale, succinate deshydrogénase, aminolévulinate synthase) est réprimée. Si la concentration intracellulaire de fer devient suffisante, la fixation des IRP au motif IRE est inhibée pour éviter toute surcharge. IRP1 assemble son centre fer-soufre et IRP2 est dégradée. Il en résulte une inhibition des mécanismes d'acquisition du fer (IREG1, DCT1, dégradation du messager du récepteur de la transferrine). Au contraire, l'utilisation et le stockage du fer sont alors favorisés, par la synthèse des différentes sous-unités de la ferritine ou des protéines consommatrices ou contenant du fer (Hentze et Kühn 1996).

I-D-4 Mise en évidence des différents sites actifs de IRP1

L'analyse des éléments d'IRP1 responsables soit de l'activité aconitase, soit de la reconnaissance des IRE a élucidé en partie son fonctionnement.

I-D-4-a Résidus impliqués dans l'activité aconitase

La détermination des résidus impliqués dans l'activité aconitase de l'homologue mitochondrial d'IRP1 (Beinert *et coll.* 1996) a permis de simplifier l'identification de ceux d'IRP1 jouant un rôle similaire, par comparaison des séquences primaires. De manière non exhaustive, des études de mutagenèse dirigées ont montré que les 3 cystéines ligands de

l'agrégat fer-soufre (C437, C503 et C506) sont indispensables à l'activité aconitase (Philpott *et coll.* 1994, Hirling *et coll.* 1994), comme la sérine 778 (Philpott *et coll.* 1994). Le remplacement de ce résidu conduit à une protéine inactive bien que l'agrégat fer-soufre soit correctement assemblé. Aussi, le changement de l'arginine 699, homologue de l'un des résidus permettant la fixation du substrat dans l'aconitase mitochondriale, engendre une protéine IRP1 moins active que la protéine sauvage (Hirling *et coll.* 1994).

I-D-4-b Résidus impliqués dans la fixation du motif IRE

Les modifications des résidus ligands du centre [4Fe-4S], notamment celles résultant des mutations conduisant aux formes C437S et C503S/C506S d' IRP1 (Hirling *et coll.* 1994, Philpott *et coll.* 1994) génèrent des protéines constitutivement capables de fixer le motif IRE. L'état réduit de ces cystéines est aussi une condition importante pour la fixation de l'ARN (Philpott *et coll.* 1994). Les résidus arginines et lysines des protéines sont souvent importants dans la liaison aux acides nucléiques (Puglisi *et coll.* 1992, Harada et Frankel 1995). Ainsi, la substitution des arginines 536, 541 ou 780 diminuent l'affinité d'IRP1 pour le motif IRE (Philpott *et coll.* 1994). Grâce à des expériences de réticulation du motif IRE sur IRP1, un peptide en interaction avec l'ARN, correspondant aux résidus 121-130, a pu être identifié (Basilion *et coll.* 1994b). Plus récemment une étude de mutagenèse dirigée contre divers peptides, supposés être en surface de la protéine, a mis en évidence l'importance des résidus d'arginine 728 et 732 dans le contact avec l'IRE, notamment au niveau de la cytosine non appariée, et de la région 685-689 dans la reconnaissance de la boucle d'ARN (Kaldy *et coll.* 1999).

I-D-4-c Localisation des sites actifs

De par son homologie avec la protéine IRP1 et de par la conservation de l'activité enzymatique aconitase dans cette dernière, la structure cristallographique de l'aconitase mitochondriale (Robbins et Stout 1989, Lauble *et coll.* 1992) sert de modèle structural à la protéine IRP1 sous sa forme contenant le centre [4Fe-4S]. Ce modèle a permis de localiser les différents résidus impliqués dans les deux activités de la protéine IRP1, dont certains sont communs, comme par exemple les cystéines ligands. Sur la figure I-7 reprenant la structure de l'aconitase mitochondriale, sont représentés certains des différents résidus impliqués dans l'une ou l'autre des activités de IRP1. Ceux-ci se situent au niveau d'une faille située entre les

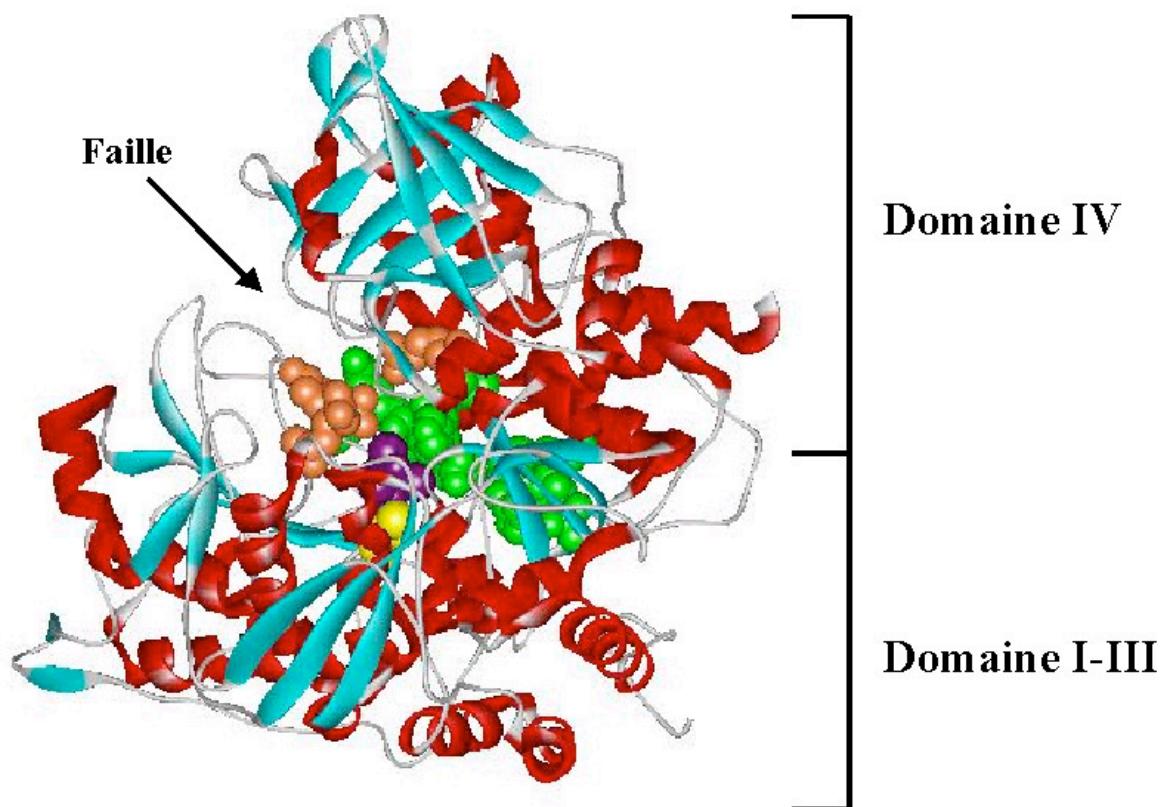


Figure I-7 : Modèle de IRP1 basé sur la structure cristallographique de l'aconitase mitochondriale de bœuf (Code PDB : 1AMJ). Représentation de quelques résidus impliqués dans les différentes activités de IRP1.

Rouge : hélices α ; Bleu : feuillet β ; Gris : tours et non ordonné.

Violet : centre[4Fe-4S]; Jaune : C437; Vert : peptide 121-130; Orange : R536, R541, R780.

domaines I-III et le domaine IV et nombre d'entre eux se superposent, en accord avec le fait que les deux activités sont mutuellement exclusives. Sur la base de ce modèle, la tige boucle d'ARN pourrait se loger au niveau de cette fissure, mais pour cela, à cause de l'encombrement stérique, un certain réarrangement semble nécessaire (Paraskeva et Hentze 1996).

I-D-5 Mécanismes de régulation mis en jeu

I-D-5-a IRP2

Les mécanismes par lesquels IRP2 est régulée sont en partie déterminés. Lors de l'augmentation de la concentration cellulaire en fer, IRP2 subit une modification par oxydation d'un ou plusieurs de ses résidus, caractérisée par la formation de groupements carbonyles (Iwai *et coll.* 1998). Cette modification se produit sur le peptide de 73 acides aminés supplémentaires par rapport à la séquence d'IRP1. Celui-ci contient 5 résidus cystéine qui sont souvent associés à la ligation du fer; ainsi, la fixation d'un ou plusieurs ions de ce métal pourrait aider à la génération catalytique d'espèces capables de modifier les protéines, comme le radical hydroxyle. La protéine ainsi modifiée est alors ubiquitinylée (Iwai *et coll.* 1998) et dégradée par le protéasome (Ciechanover 1994). C'est pourquoi la synthèse *de novo* d'IRP2 est nécessaire pour retrouver l'activité régulatrice de fixation aux IRE (Guo *et coll.* 1994).

I-D-5-b IRP1

Les mécanismes de régulation de IRP1 sont totalement différents sans nouvelle synthèse de protéine, mais par l'assemblage ou le désassemblage d'un centre fer-soufre.

I-D-5-b-i Le démantèlement du centre fer-soufre

La formation d'intermédiaires de dégradation de l'agrégat [4Fe-4S] *in vivo* n'ont jamais été rapportés. *In vitro*, l'espèce [3Fe-4S] peut être générée (Kennedy *et coll.* 1992). La présence d'une forme composée de complexe de fer dinitrosyle a aussi été détectée lors de la réaction de la protéine avec le monoxyde d'azote (Kennedy *et coll.* 1997). Néanmoins, aucun autre intermédiaire contenant du fer n'a, à ce jour, été caractérisé, notamment la formation d'un intermédiaire [2Fe-2S]. Dans le cas de la protéine FNR de *Escherichia coli*, un facteur de

transcription qui module son activité en fonction de la concentration en oxygène, l'échange entre une forme fonctionnelle contenant un agrégat [4Fe-4S] et une forme inactive contenant un centre [2Fe-2S] (Kiley et Beinert 1999) se fait de manière réversible.

I-D-5-b-ii L'assemblage du centre fer-soufre

De même, les mécanismes d'assemblage de l'agrégat fer-soufre dans la protéine IRP1 *in vivo* sont encore inconnus, bien qu'*in vitro* la formation du centre métallique s'effectue facilement par l'ajout de fer et de soufre dans un milieu réducteur.

De nombreuses études dans la levure tendent à montrer que l'assemblage des centres fer-soufre s'effectue uniquement dans les mitochondries grâce à un ensemble de protéines provenant de l'opéron ISC, pour *Iron Sulfur Cluster* (Lill *et coll.* 1999, Mühlenhoff et Lill 2000) et d'autres protéines accessoires. Les protéines Isc sont homologues à celles codées par l'opéron *nif* d'*Azotobacter vinelandii* qui est indispensable à la maturation de la nitrogénase, une enzyme à centre fer-soufre, dans cet organisme fixateur d'azote (Dean *et coll.* 1993). Parmi les activités présentes figure une cystéine désulfurase (IscS) qui génère du soufre inorganique à partir de cystéine. D'autres protéines sont capables de lier, soit des centres [2Fe-2S], soit des centres [4Fe-4S]. Des protéines chaperones de type DnaJ et DnaK sont aussi impliquées. De plus un transporteur de type ABC et une protéine contenant un domaine oxidoréducteur semblent responsables de l'exportation de l'agrégat de la mitochondrie, sous une forme encore non identifiée (pour revue Lill *et coll.* 1999, Lill et Kispal 2000, Mühlenhoff et Lill 2000, Lange *et coll.* 2001). Néanmoins, la localisation cytosolique ou nucléaire de protéines Isc a été démontrée (Land et Rouault 1998, Tong et Rouault 2000, Nakai *et coll.* 2001).

I-E Objectifs du travail de thèse

C'est devant ce constat de lacunes dans la connaissance des mécanismes d'activation et de désactivation de la protéine IRP1 que nous avons essayé d'intervenir.

Pour cela, il nous a fallu dans un premier temps consacrer nos efforts à l'obtention de quantités de protéine humaine IRP1 suffisantes pour caractériser les événements moléculaires pouvant l'affecter dans diverses conditions. Nous avons mis en place une approche recombinante qui nous a fourni la protéine sous sa forme [4Fe-4S].

Dans un second temps des études de la réactivité de la protéine IRP1 ont été mise en œuvre, afin de comprendre les mécanismes d'action de divers composés capables de modifier les activités de la protéine IRP1. Une partie de l'étude s'est focalisée sur l'étude de diverses espèces réactives de l'oxygène générées lors des situations de stress oxydant. Puis, l'effet de la doxorubicine, un puissant anticancéreux, dont la réactivité est fortement liée à la présence de fer, a été étudié. Enfin, le phénomène d'activation *in vitro* de la protéine pour la fixation au motif IRE par le thiol réducteur, 2-mercaptoéthanol, a été abordé.

La recherche de possibles partenaires physiologiques de la protéine IRP1, notamment des protéines capables de moduler l'état d'activation de la protéine IRP1, a été mise en œuvre par une étude "double hybride" dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

En parallèle, nous avons tenté de mettre en place une nouvelle méthode analytique de dosage de l'activité de fixation des IRP au motif IRE. En effet la méthode conventionnelle par retard sur gel met en œuvre la manipulation de radioéléments et nécessite un temps d'analyse relativement long, tout en étant difficilement automatisable.

Finalement, les quantités et la pureté de la protéine recombinante IRP1 obtenue, nous a permis d'initier des études structurales des deux formes actives de la protéine : la forme aconitase et la forme capable de lier l'ARN.

PRODUCTION, PURIFICATION ET CARACTERISATION DE rhIRP1.

La plupart des études sur les IRP s'effectuent à l'aide d'extraits cellulaires. Rares sont celles portant directement sur la protéine purifiée, bien que celle-ci soit utile pour bon nombre d'expériences (études structurales, synthèse d'anticorps, etc...). Le fait que la protéine puisse exister sous différentes formes ([4Fe-4S], [3Fe-4S], apoprotéine, apoprotéine oxydée, etc...) aisément interconvertibles *in vivo* peut expliquer certaines difficultés dans sa manipulation.

La majorité des stratégies utilisées pour la purification d'IRP1 ont été basées sur des méthodes d'affinité. Ainsi l'IRP1 humaine a été produite dans *Escherichia coli* avec une ancre Glutathion S-Transférase (GST) pour une purification sur une colonne greffée avec du glutathion (Hirling *et coll.* 1994).

Une stratégie semblable a été utilisée par Gray *et coll.* (Gray *et coll.* 1993), avec l'insertion d'une ancre de 6 histidines à l'extrémité N-terminale de la protéine (His-Tag). Ce cluster de 6 histidines forme un motif chélatant des métaux de transition, tels que le nickel, et permet de fixer la protéine sur une colonne liant un tel métal par l'intermédiaire de groupements d'acide nitriloacétique (NTA). Sur le même principe, Phillips *et coll.* (Phillips *et coll.* 1996) ont purifié les protéines IRP1 et IRP2, en utilisant un système d'expression eucaryote, la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

D'autres ont préféré utiliser les interactions spécifiques entre les IRP et les motifs IRE. Rouault *et coll.* (Rouault *et coll.* 1989) ont opté pour l'utilisation d'un motif IRE dérivé d'un de ceux existant dans la partie 3' du messenger du récepteur de la transferrine. Celui-ci, biotinylé, a été copurifié avec IRP1 par couplage avidine-biotine et a permis d'isoler spécifiquement la forme fixatrice du motif IRE de la protéine IRP1 de foie humain. Eisenstein *et coll.* (Eisenstein *et coll.* 1997), par une stratégie identique, ont pu isoler la protéine IRP1 de rat.

Enfin Yu *et coll.* (Yu *et coll.* 1992) ont utilisé une colonne d'héparine agarose pour obtenir l'IRP1 de foie de rat, l'héparine mimant le motif polynucléotidique de l'ARN.

Seuls Kennedy et coll. (Kennedy *et coll.* 1992) et Babilion et coll. (Babilion *et coll.* 1994a) ont directement et rapidement purifié la protéine IRP1 de foie de bœuf et la protéine recombinante produite dans un système baculovirus/cellules d'insectes, respectivement, sans étape d'affinité.

Il apparaît que ces méthodes basées sur une interaction spécifique, permettent de simplifier grandement le protocole de purification, mais ne conduisent pas à l'obtention de quantités suffisantes pour la mise en place de certaines études très consommatrices de matériel.

Dans le but de circonvenir aux limitations en quantité de matériel utilisable, nous avons décidé d'essayer de surproduire la protéine IRP1 humaine non modifiée dans *Escherichia coli*. En effet, il n'existe pas d'évidence forte montrant une modification post traductionnelle d'IRP1 propre aux systèmes eucaryotes, telle que la glycosylation de certains résidus. L'insertion de centres fer-soufre se produit chez les bactéries comme chez les eucaryotes. La seule autre modification post-transcriptionnelle qui a pu être observée est la phosphorylation *in vitro* d'IRP1 par la protéine kinase C (Eisenstein *et coll.* 1993). Toutefois, la possibilité d'une telle phosphorylation *in vivo* n'a, à ce jour, toujours pas été démontrée. Il est donc envisageable de faire synthétiser cette protéine provenant d'un organisme eucaryote par un procaryote, en essayant de profiter des grandes quantités de biomasse facilement accessibles avec les systèmes d'expression bactériens.

Pour cela, la production d'IRP1 recombinante dans *Escherichia coli* a été mise en œuvre à l'aide d'un plasmide contenant un promoteur du phage T7 ($\Phi 10$). Ce type de vecteur permet la surexpression spécifique des gènes clonés en aval de ce promoteur. Un des avantages de ce système est que son utilisation pour la synthèse de protéines recombinante à centres fer-soufre fonctionnels a déjà largement été rapportée (Davasse et Moulis 1992, Fujinaga et Meyer 1993, Atta *et coll.* 1998, Chatelet *et coll.* 1999).

II-A Résultats

Les stratégies de purification par affinité doivent faire face à certaines difficultés, telles que la nécessité de cliver l'ancre GST, l'obtention d'une protéine modifiée par une queue poly-histidine N-terminale ou facilement oxydable dans la forme liant l'ARN. Nous avons donc décidé de faire synthétiser la protéine mature et, pour cela, le plasmide pT7-His-IRF, codant pour la protéine IRP1 humaine précédée de 6 histidines en position N-terminale (Gray *et coll.* 1993) a été modifié afin de supprimer cette ancre d'affinité.

II-A-1 Expression

Le plasmide pT-IRP5-B2 généré (Cf chapitre VIII-E-1), contenant le gène intact de la protéine IRP1 humaine sous la dépendance du promoteur $\Phi 10$, a été utilisé pour transformer la souche d'*Escherichia coli* K38/pGP1-2 en vue d'une production en masse de la protéine, grâce au système d'induction de l'ARN polymérase du phage T7 par inhibition du régulateur thermosensible cI856.

Un test de production sur un faible volume a été réalisé en présence de 6 μ Ci de cystéine radioactive ($[^{35}\text{S}]$ -Cystéine) et 5 μ l de rifampicine (20 mg/ml dans le méthanol), un inhibiteur des ARN polymerases d'*Escherichia coli*, juste après l'induction par le choc thermique afin de visualiser la neo-synthèse de protéines. Le contenu de ces cellules lysées a été séparé sur un gel dénaturant à 7.5% de polyacrylamide et les protéines marquées ont été visualisées par autoradiographie (Figure II-1).

Le résultat montre une bande aux alentours de 97 KDa, compatible avec la taille attendue de la protéine recombinante IRP1 humaine (rhIRP1).

L'activité de fixation au motif IRE (Cf chapitre VII-F-5), en présence de 2% 2ME, de l'extrait total de cellules K38/pGP1-2/pT-IRP5-B2 induites a été comparée à celle des extraits de K38/pGP1-2/pT7-7 (Figure II-2). Dans le puit B, correspondant à 5 μ g d'extrait de K38/pGP1-2/pT-IRP5-B2, une bande retardée est visible alors que dans le puits A, correspondant à 5 μ g d'extrait de K38/pGP1-2, seule la sonde ARN libre apparaît.

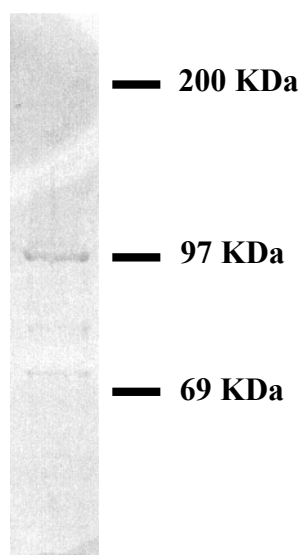


Figure II-1 : Autoradiographie d'un aliquote des extraits cellulaires de la souche d'*Escherichia coli* K38/pGP1-2/pTIRP5-B2 après induction à 42°C (~ 60 nCu).

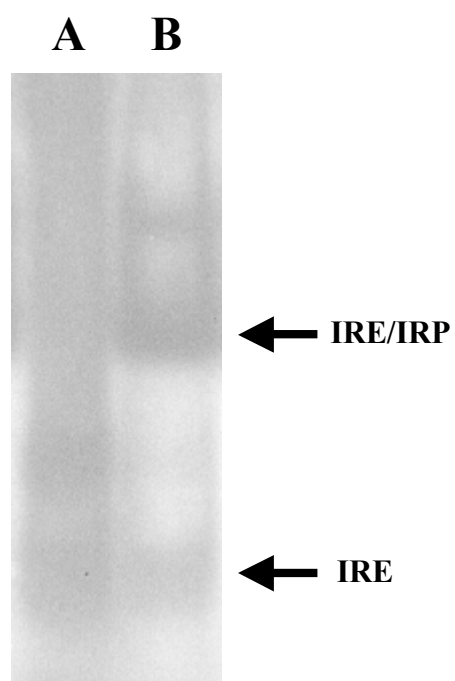


Figure II-2 : Dosage de l'activité de fixation au motif IRE de 5 µg des extraits totaux des souches induites d'*Escherichia coli* K38/pGP1-2/pT7-7 (puits A) et K38/pGP1-2/pTIRP5-B2 (puits B).

La synthèse d'une protéine de 97 KDa, ainsi que la présence d'activité de fixation au motif IRE, spécifiquement dans les extraits de K38/pGP1-2/pT-IRP5-B2, montre que la protéine IRP1 codée par le plasmide pT-IRP5-B2 est bien synthétisée dans la cellule sous une forme fonctionnelle pour sa fixation au motif IRE.

Même si la protéine IRP1 peut exister sous une forme contenant un centre [4Fe-4S] et posséder ainsi une activité aconitase, nous n'avons pas effectué le dosage de cette activité enzymatique dans les extraits bactériens bruts à cause de la contribution des aconitases d'*Escherichia coli* (AcnA et AcnB).

II-A-2 Purification

La purification de la protéine IRP1 a donc été initiée et celle-ci étant synthétisée sous sa forme mature en absence d'ancre d'affinité, nous avons utilisé les caractéristiques intrinsèques de la protéine (poids moléculaire, pI, hydrophobicité,...) afin de l'isoler grâce à différentes étapes chromatographiques (gel filtration, échanges d'ions, interactions hydrophobes, etc...).

Il existe de nombreuses données (Hentze et Kühn 1996, Bouton 1999) montrant que les IRP sont des protéines sensibles aux conditions redox, soit par la présence d'un centre fer-soufre pour la forme aconitase cytosolique, soit celle de cystéines facilement oxydables pour la forme fixatrice d'IRE. Des précautions ont donc été observées afin d'éviter la destruction de l'agrégat métallique par l'oxygène et l'oxydation des cystéines de la forme apoprotéine. Pour cela, l'utilisation de tampons saturés en argon, ainsi que le balayage par un léger flux d'argon des solutions de protéines, ont été maintenus tout du long de la purification à l'aide de rampes à argon et d'une enceinte anaérobie.

Les culots cellulaires de K38/pGP1-2/pTIRP5-B2 obtenus au cours de cette thèse, ont tous été traités selon le protocole décrit au chapitre matériels et méthodes (VIII-E-3). L'activité aconitase des différentes fractions recueillies en cours de purification a été mesurée afin de suivre la présence de la protéine IRP1 sous sa forme contenant le centre fer-soufre et leur composition a été analysée sur un gel dénaturant à 10% de polyacrylamide. Sur la figure II-3 est représenté un tel gel montrant l'évolution au cours d'une purification effectuée

lors de ce travail et le tableau II-1 présente l'évolution de l'activité spécifique au cours de cette même purification.

Le profil protéique, principalement à partir de l'étape de purification par interactions hydrophobes, présente une intensification d'une bande aux alentours de 97 KDa. L'étape préalable de purification d'échanges d'ions est réalisée dans le but d'éliminer les aconitases d'*Escherichia coli* (AcnA et AcnB) dont le pI calculé, respectivement 5.6 et 5.3, permet la rétention spécifique sur la résine échangeuse d'anions dans les conditions utilisées. Cette élimination est en accord avec l'observation de la diminution de l'activité spécifique de la solution après cette étape de purification (Tableau II-1).

Les étapes ultérieures s'accompagnent toutes d'une intensification de la bande à 97 KDa (Figure II-3), ainsi que d'une augmentation progressive de l'activité spécifique (Tableau II-1), démontrant la purification d'une protéine associée à l'activité aconitase.

II-A-3 Caractérisation du produit purifié

Avec un rendement moyen de 4 mg/litre de culture, sur l'ensemble des purifications effectuées au cours de cette thèse, le protocole de purification utilisé permet d'obtenir un produit de couleur brunâtre qui, après l'étape finale d'échange d'anions par chromatographie liquide haute performance, se caractérise par une bande unique à 97 KDa, sur le gel dénaturant à 10% de polyacrylamide (Figure II-3). Ceci est en accord avec le poids moléculaire de la protéine IRP1 calculé à partir de sa séquence.

La bande protéique a été transférée sur une membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF) (Cf chapitre VIII-D-4). Après coloration de la membrane au bleu de Coomassie, la bande située à 97 KDa a été découpée et le séquençage suivant la méthode d'Edman a été entrepris par J-P. Andrieu, IBS-LEM, Grenoble, France, sur un séquenceur automatique (477A - Applied Biosystems). Ceci a permis d'identifier les 11 premiers résidus de l'extrémité N-terminale:

SNPFAHLAEPL

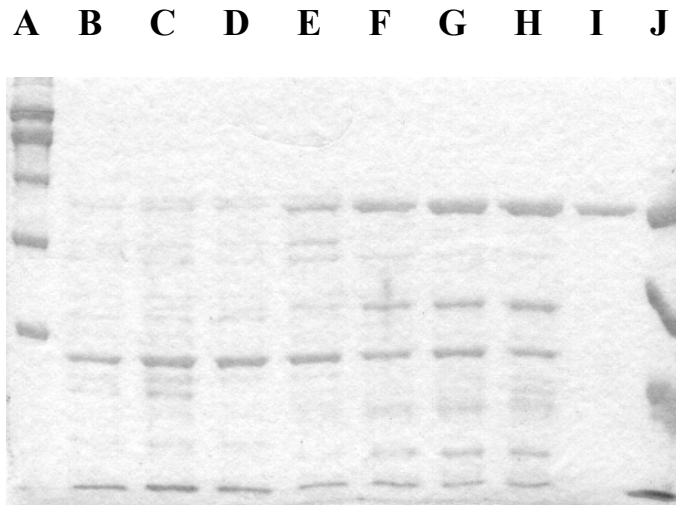


Figure II-3 : Analyse des différentes étapes de purification sur gel dénaturant de polyacrylamide 10%.

A, J = Masses moléculaires : 212 KDa, 170 KDa, 116 KDa, 97 KDa, 76 KDa, 66 KDa, 53 KDa, 45 KDa et 30 KDa; de haut en bas.

B = 4 µg d'extraits cellulaires de *E.coli* K38/pGP1-2/pTIRP5-B2;

C = 4 µg de solution de la fraction [25%-65%] de précipitation au sulfate d'ammonium;

D = 4 µg de la fraction de l'étape d'échange d'ions sur CM52/DE52;

E = 4 µg de la fraction de l'étape d'interactions hydrophobes sur Phenyl Sepharose;

F = 4 µg de la fraction de l'étape de gel filtration sur Superdex 200;

G = 4µg de la fraction de l'étape d'interactions hydrophobes sur Fractogel EMD Phenyl (S);

H = 4µg de la fraction de l'étape de chromatographie sur résine d'hydroxyapatite (Macrorep Ceramic Hydroxyapatite);

I = 3 µg de la fraction de l'étape de CLHP d'échange d'anions sur PL-SAX;

Fraction	Activité Spécifique <i>nmol / (min.mg)</i>
Extraits cellulaires	3000
Précipitation [25%-65%] au sulfate d'ammonium	3500
Echange d'ion CM52/DE52	1600
Interaction Hydrophobe sur Phenyl Sepharose	2000
Gel Filtration sur Superdex 200	2500
Interaction hydrophobes sur Fractogel EMD Phenyl (S)	2800
Chromatographie sur résine d'hydroxyapatite (Macroprep Ceramic Hydroxyapatite)	3000
CLHP d'échange d'anions sur PL-SAX	20000

Tableau II-1 : Activité spécifique aconitase des différentes fractions de purification.

Cette séquence est en accord avec la séquence de la protéine IRP1 humaine déduite de la séquence nucléotidique (Hirling *et coll.* 1992), dans laquelle la méthionine N-terminale a été clivée. Ceci confirme que la protéine purifiée est bien la protéine IRP1 humaine.

Un spectre d'absorption de rhIRP1 (Figure II-4) a été enregistré à la sortie de la colonne d'échange d'anion par chromatographie liquide haute performance (PL-SAX).

Ce spectre présente un pic à 280 nm auquel les résidus aromatiques de la chaîne polypeptidique (tryptophanes, tyrosines et phénylalanines) contribuent. De plus, une bande d'absorption large entre 300 et 550 nm est compatible avec la présence d'un centre de type [3/4Fe-4S] dans lequel un ensemble de transitions de transfert de charge des atomes de soufre vers les atomes de fer donne la couleur des protéines les contenant.

La présence du centre [4Fe-4S] peut être déduite de l'activité aconitase de la protéine purifiée (mesure de la vitesse de disparition du *cis*-aconitate, utilisé comme substrat, qui absorbe à 240 nm). L'activité spécifique de rhIRP1 purifiée est de l'ordre de 20000 nmole/(min.mg).

250 μ M de rhIRP1 ont été mis en présence d'un excès de DTT (10 mM) durant 4 heures en absence d'oxygène. Puis un excès de fer (2 mM FeSO₄) et un excès de soufre (2 mM Na₂S) ont été ajoutés. Le mélange a été maintenu durant 1 heure toujours en absence d'oxygène, afin d'assembler les agrégats fer-soufre de la protéine éventuellement manquants, par similitude avec ce qui a été réalisé pour l'aconitase mitochondriale (Kennedy *et coll.* 1983). Après filtration sur gel en 20 mM Tris-Cl pH7.4 / Citrate 200 μ M, un aliquote de la protéine ainsi traitée a été dosé pour son activité aconitase. L'activité spécifique obtenue est de l'ordre de 23000 nmole/(min.mg).

Ainsi, ce traitement ne permet pas d'observer un gain important d'activité spécifique de la solution de protéine purifiée (15%) et indique que cette préparation est sans doute déjà majoritairement présente sous la forme aconitase [4Fe-4S].

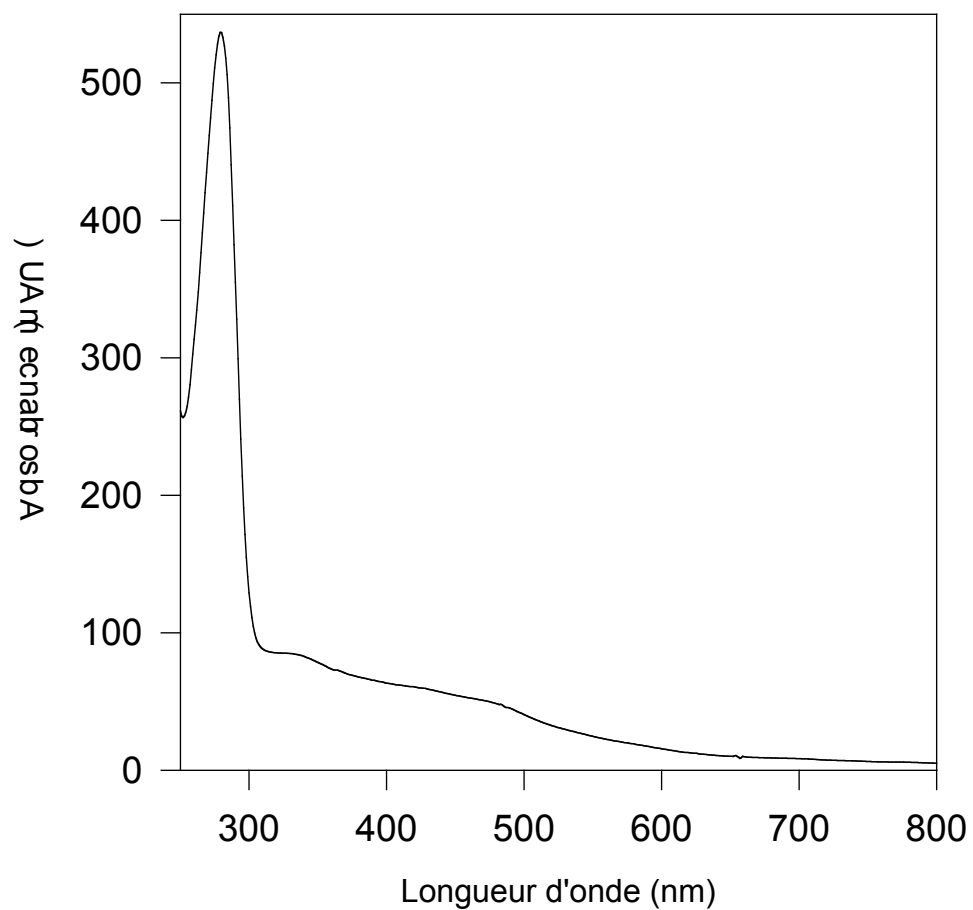


Figure II-4 : Spectre d'absorption UV-Visible de rhIRP1 à la sortie de la colonne d'échange d'anion par chromatographie liquide haute performance PL-SAX .

Un dosage de l'activité de fixation au motif IRE a été réalisé avec la protéine purifiée en présence de différentes concentrations de 2ME (0, 0.01 et 2%), permettant de révéler la proportion d'IRP, respectivement capable de fixer l'ARN dans la solution, d'activer les IRP existant sous forme apoprotéine oxydée et de révéler la totalité des IRP pour leur activité de fixation au motif IRE (Figure II-5) (Bouton *et coll.* 1997, Haile *et coll.* 1992a).

La faible intensité de la bande correspondant au complexe IRE-IRP1 sans 2ME, mais aussi en présence de 0.01% de 2ME, démontre que la forme fixatrice d'IRE de rhIRP1 et que la forme apoprotéine oxydée ne représentent qu'une faible proportion de la préparation, mais que la forme fixatrice du motif IRE de la protéine peut être efficacement générée *in vitro* avec 2% 2ME.

Par homologie avec l'aconitase mitochondriale, mais aussi comme il a été rapporté par Kennedy *et coll.* (Kennedy *et coll.* 1992), la protéine IRP1 peut exister sous une forme [3Fe-4S]. Cet agrégat fer-soufre, dans sa forme oxydée $[3\text{Fe-4S}]^{+1}$, intègre 3 ions ferriques (Fe^{3+}) couplés pour donner un spin résultant de 1/2, visible en résonance paramagnétique électronique (RPE). A 10K, un faible signal RPE axial de valeurs de g ($g_{\parallel} = 2.03$, $g_{\perp} = 2.014$) est détecté (VIII-J-3) (Figure II-6).

Ce type de signal a déjà été fréquemment observé pour des molécules contenant des agrégats [3Fe-4S] (Beinert et Thomson 1983) et est semblable à celui rapporté pour cette même protéine (Kennedy *et coll.* 1992). Malgré la faiblesse du signal, celui-ci a pu être quantifié, par rapport à une solution de Cu^{2+} /EDTA de concentration connue, à moins de 0.1 spin par molécule, ce qui représente donc moins de 10% des protéines totales.

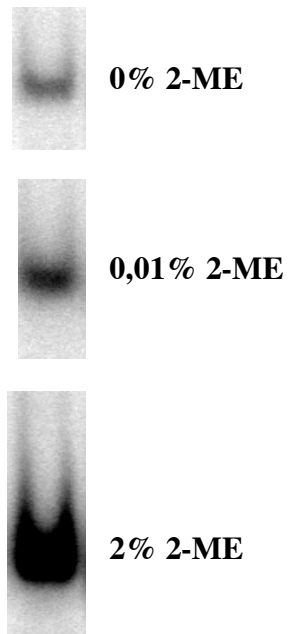


Figure II-5 : Bandes retardées lors de la fixation au motif IRE de 4 ng de rhIRP1 avec les quantités de 2ME indiquées.

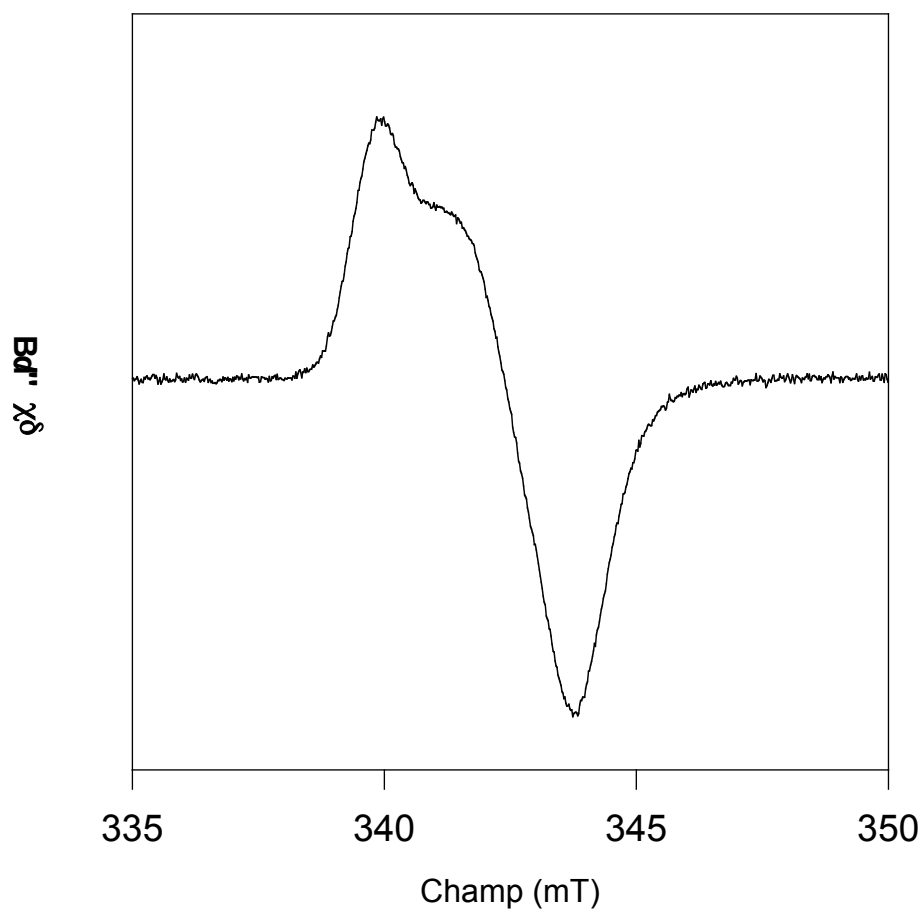


Figure II-6 : Spectre RPE de 20 μ M de rhIRP1.

Conditions d'acquisition : température 10 K, fréquence 9.656 GHz, puissance 0.01 mW, modulation 100 KHz.

II-A-4 Analyse de la protéine rhIRP1 par spectrométrie de masse (ESI-MS)

II-A-4-a Théorie de la spectrométrie de masse ESI-MS

La spectrométrie de masse ESI-MS consiste dans un premier temps à générer, grâce au phénomène d'électro-nébulisation, des formes chargées de la protéine à analyser et, dans un second temps, de séparer et d'analyser ces ions selon leur rapport m/z .

II-A-4-a-i Phénomène d'électro-nébulisation

Le mécanisme d'électro-nébulisation, bien que non totalement élucidé, peut se décrire simplement. L'injection d'une solution à analyser dans un capillaire porté à un haut potentiel électrique provoque la formation d'un nuage de gouttelettes chargées à la sortie du capillaire. Un autre fort potentiel électrique permet d'accélérer les gouttelettes en direction de l'analyseur. Durant le transport à travers le champ électrique, et en appliquant un gradient de pression, la taille des gouttelettes diminue par évaporation du solvant par explosions "coulombiennes" successives (divisions spontanées de la gouttelette chargée en gouttelettes plus petites, provoquées par une charge surfacique très élevée). Cette nébulisation est facilitée par l'injection en flux continu de l'échantillon, l'échauffement du capillaire, ainsi que par l'utilisation d'un flux de gaz, qui aident à l'évaporation du solvant. Les ions ainsi formés sont canalisés par un ensemble d'échantillonneurs vers l'analyseur où règne un vide très poussé (10^{-6} Torr) pour éviter les collisions entre les différents ions.

II-A-4-a-ii Analyse

Les modes d'analyse diffèrent selon le type de spectromètre utilisé (temps de vol, secteurs magnétiques, quadripolaire ou résonance ionique cyclotronique par transformée de Fourier). Pour cette étude, un spectromètre de masse à secteurs magnétiques a été utilisé et seul ce mode de détection sera décrit. Bien qu'il ne soit certainement pas le plus simple d'emploi et le moins encombrant, ce type de spectromètre présente une gamme de mesure et un pouvoir résolutif plus élevés que les autres types de spectromètres et permet donc une bonne mesure des protéines de haut poids moléculaire.

Les ions formés par électro-nébulisation sont accélérés par la différence de potentiel appliquée à l'extrémité du capillaire. L'énergie cinétique acquise est proportionnelle au nombre de charges de l'ion et à la valeur de la différence de potentiel (Equation II-1).

$$1/2mv^2 = zV \quad \text{Equation II-1}$$

Ces ions sont alors soumis à un champ magnétique B, perpendiculaire à la direction de propagation rectiligne des ions, qui applique une force perpendiculaire à leur trajectoire et à la direction du champ magnétique d'une valeur égale à : Bzv .

Cette force correspond à la force centripète d'un mouvement circulaire uniforme dont la valeur est égale à mv^2/R , où R correspond au rayon de la trajectoire, donc :

$$Bzv = mv^2/R$$

d'où

$$R = mv/Bz \quad \text{Equation II-2}$$

Ainsi R est proportionnel à la valeur du champ B et en remplaçant l'équation II-1 dans l'équation II-2 on obtient :

$$R = (2Vm/B^2z)^{1/2}$$

d'où

$$\mathbf{m/z = B^2R^2/2V}$$

Ainsi, pour des valeurs de B et de V données, les ions de rapport m/z parcourent dans le champ magnétique une trajectoire circulaire de rayon R.

Au niveau de l'analyseur, une seule valeur fixe de R est mesurée. La tension V étant donnée, la variation de la valeur du champ magnétique B permet la détection successive des ions de différents rapports m/z, représentés sous la forme de spectre d'abscisse m/z et où l'ordonnée correspond à l'intensité du pic, donc à la quantité d'ion m/z.

II-A-4-b Résultats

Une analyse préliminaire par spectrométrie de masse a été effectuée sur une préparation de rhIRP1. Les spectres obtenus lors de ces essais ont montré une forte présence d'adduits dus à l'utilisation de tampon (Tris) et de sels (NaCl) au cours de la purification, qu'il n'a pas été possible d'éliminer suffisamment par dessalages successifs par dilution/concentration avec de l'acétate d'ammonium dilué. Ainsi, le protocole de purification a légèrement été modifié afin de minimiser la formation de tels adduits.

Pour cela, à partir de la dernière étape de purification par interaction hydrophobe, le tampon Tris utilisé en routine a été remplacé par du tampon HEPES. En effet, ce tampon est un acide au contraire du tampon Tris, et, sa masse étant plus élevée, il peut permettre de mieux séparer les pics supplémentaires dus aux adduits qui subsistent éventuellement. Enfin pour l'ultime étape de purification sur le système CLHP, les tampons usuels (chapitre VIII-E-3-g) ont été substitués par 20mM HEPES-OH pH 7.4/ Citrate 200 μ M et 0.4 M d'acétate d'ammonium pH 7.4 / Citrate 200 μ M afin d'éviter l'utilisation du chlorure de sodium. IRP1 purifié a été placé en présence de fer et de soufre selon le protocole décrit précédemment (II-I-3) pour reformer les centres [4Fe-4S] éventuellement dégradés, avant d'être dessalé en tampon 20 mM d'acétate d'ammonium pH 7.4.

L'analyse par spectrométrie de masse de 10 μ M de la protéine rhIRP1 ainsi purifiée a été réalisée par le Dr F. Halgand, ISCN, Gif/Yvette, France, selon le protocole décrit dans le chapitre matériel et méthodes (VIII-J-4).

La détection des espèces chargées positivement a permis d'obtenir un spectre (Figure II-7) caractérisé par un ensemble de 5 pics à des valeurs de m/z de 5491.0, 5201.8, 4941.6, 4707.1 et 4486.8 Da.

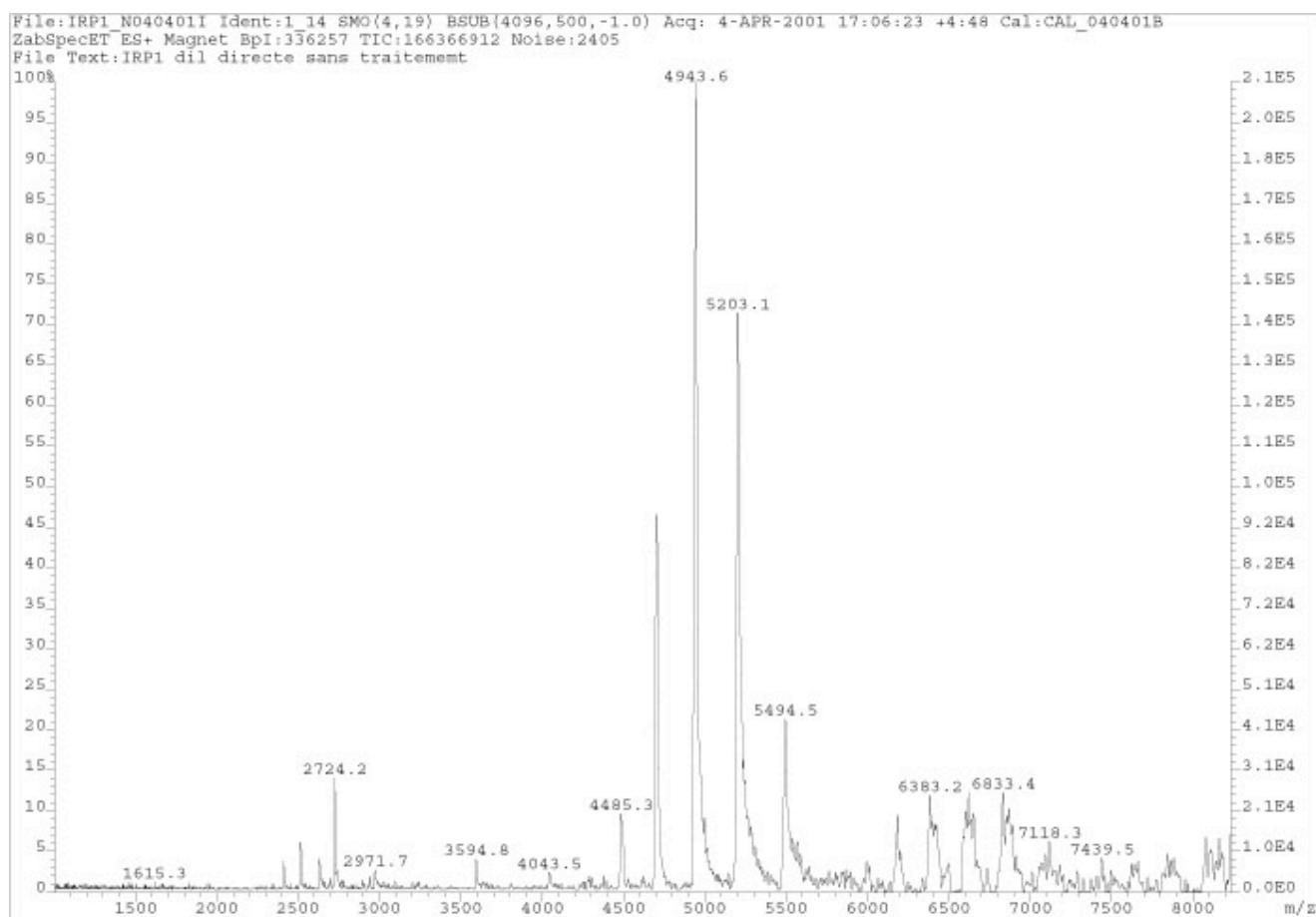


Figure II-7 : Spectre ESI-MS de rhIRP1

m/z	z	m	M
5491.0	18	98838.0	98820.0
5201.8	19	98834.2	98815.2
4941.6	20	98832.0	98812.0
4707.1	21	98949.1	98828.1
			98818.8

Tableau II-2 : Charges et masses associées aux différentes valeurs de m/z
 du spectre ESI-MS de rhIRP1

Pour calculer la masse moléculaire (M) de la protéine analysée, il faut dans un premier temps connaître la valeur de la charge associée à chaque pic. Pour cela, la valeur de z du pic à $m/z = 5201.8$ Da est déterminée grâce à la résolution du système d'équation ci dessous.

$$. m/z = 5201.8$$

$$. m/(z+1) = 4941.6$$

d'où

$$5201.8 z = 4941.6 (z + 1)$$

d'où

$$260.2 z = 4941.6$$

et

$$z = 4941.6 / 260.2 = 18.99 \sim 19$$

Le pic à 5201.8 Da correspond donc à une valeur de charge (z) égale à 19. De la même manière, les valeurs de z des autres pics ont été calculées : le pic à $m/z = 5491.0$ Da a été associé à une charge de 18, le pic à $m/z = 4941.6$ Da à une charge de 20 et le pic à $m/z = 4707.1$ Da à une charge de 21.

Le spectre étant acquis en mode positif (polarisation de l'analyseur pour la détection des espèces chargées positivement), la valeur m/z mesurée correspond à la valeur de masse de l'ion z fois chargé positivement. La charge étant majoritairement portée par des protons, il est donc nécessaire de retrancher z fois la masse du proton à la valeur m mesurée pour obtenir la masse moléculaire de la protéine (M) associée à chaque pic. Par exemple, le pic à $m/z = 5201.8$ Da, qui correspond à l'ion 19 fois chargé, présente une masse de l'espèce chargée de $5201.8 \times 19 = 98834.2$ Da. La masse moléculaire de la protéine calculée à partir de ce pic est donc de $98834.2 - 19 = 98815.2$ Da.

Ainsi la masse moléculaire associée aux différents pics a été déterminée (Tableau II-2) et la valeur moyenne obtenue est de 98819 Da.

Par rapport à la valeur moyenne, les valeurs mesurées se situent toutes dans une plage de plus ou moins 10 Da, ce qui correspond à une variation de 0.01% sur la mesure. Cet écart est inférieur à l'erreur de mesure des spectromètres de masse (environ 0.015%).

Les différents pics présentent un épaulement situé vers les valeurs de m/z plus petites. L'agrandissement du pic correspondant à l'espèce 20 fois chargée (résultat non montré) permet d'observer cet épaulement qui est difficilement séparable du pic principal. Il correspond à un écart de m/z d'environ 10 Da, ce qui équivaut approximativement à une espèce de masse moléculaire de 200 Da plus petite ($98819 - 200 = 98619$ Da).

Le calcul théorique de la masse moléculaire de la protéine rhIRP1 à l'aide de la structure primaire déduite de la séquence nucléotidique, à laquelle la méthionine N-terminale a été retirée, donne une masse de 98268 Da.

L'analyse de certaines protéines à centres fer soufre par spectrométrie de masse a été rapportée avec, notamment, la conservation de ces agrégats fer-soufre à l'intérieur de l'enveloppe protéique dans des conditions non dénaturantes (Meyer *et coll.* 1990, Moulis *et coll.* 1993, Pétillot *et coll.* 1995a, Pétillot *et coll.* 1995b).

Le spectre obtenu ayant été acquis dans de telles conditions, l'hypothèse de la conservation du centre [4Fe-4S] de la protéine IRP1 a été effectuée. La masse d'un tel agrégat (352 Da) est ajoutée à la masse théorique de la protéine purifiée, tout en considérant la déprotonation des trois cystéines ligand de l'agrégat par similitude avec l'aconitase mitochondriale. La masse moléculaire théorique de la protéine rhIRP1 possédant son centre fer-soufre est donc de 98617 Da. D'après la structure de l'aconitase mitochondriale (Lauble *et coll.* 1992), le quatrième atome de fer de l'agrégat [4Fe-4S] lie une molécule de solvant (OH ou O⁻) ce qui correspond à +16/17 Da supplémentaires à la masse totale de la protéine, compris dans l'erreur de mesure. Cette valeur correspond à l'épaulement observé sur les différents pics et est attribuée à la forme aconitase [4Fe-4S] sans son substrat.

La masse théorique comparée à la masse expérimentale majoritairement trouvée, présente une différence de 202 Da. Cette dernière est compatible avec la masse d'une molécule de substrat, le citrate, qui est utilisé tout au long de la purification afin de stabiliser l'agrégat fer-soufre et qui, par similitude avec l'aconitase mitochondriale, se lie au niveau de l'atome de fer non ligandé par une cystéine.

II-B Conclusion

La stratégie utilisée pour l'expression et la purification permet d'obtenir la protéine recombinante IRP1 humaine pure.

Bien que la méthode de purification soit plus longue que les méthodes rapportées précédemment, elle permet d'obtenir une protéine homogène sous la forme aconitase [4Fe-4S] alors que la majorité des autres purifications conduisent, soit à l'obtention de la seule forme fixatrice du motif IRE, soit à celle d'un mélange de formes.

De plus les quantités importantes de produit obtenu (4 mg/litre) permettent d'envisager de nombreuses études biochimiques parfois très consommatrices de matériel.

REACTIVITE DE rhIRP1

Il a été démontré que l'activité des IRP n'était pas uniquement contrôlée par la fluctuation de la concentration intracellulaire en fer. En effet, de nombreux autres composés peuvent modifier l'état d'activation des IRP. Par exemple, les espèces réactives dérivées de l'azote ou de l'oxygène (Drapier *et coll.* 1993, Weiss *et coll.* 1993, Pantopoulos et Hentze 1995, Pantopoulos *et coll.* 1996, Bouton *et coll.* 1996, Bouton *et coll.* 1997, Bouton *et coll.* 1998, Kim et Ponka 1999), qui sont notamment générées lors de conditions de stress comme lors de la réponse immunitaire, modifient l'activité des IRP *in vivo* ou *in vitro*.

Un autre exemple d'un composé pouvant modifier l'activité des IRP est celui du thiol réducteur β -mercaptoéthanol (2ME) qui est utilisé *in vitro* à forte concentration pour générer la forme d'IRP1 fixatrice du motif IRE (Hentze *et coll.* 1989). Des protéines réductrices, comme la thiorédoxine semblent aussi pouvoir jouer un rôle *in vivo*, sans doute par un mécanisme différent de réduction des ponts disulfures pouvant se former sur la protéine sans métal (Oliveira *et coll.* 1999).

Parmi d'autres exemples, certaines cytokines (Piñero *et coll.* 2000), certaines hormones (Thomson *et coll.* 2000) ou d'autres composés, tels des anti-tumoraux comme le nitrate de gallium (Chitambar et Wereley 1997) ou la doxorubicine (Minotti *et coll.* 1998), modifient l'état d'activité des IRP.

Nous nous sommes donc intéressés à l'étude de la réactivité de la protéine IRP1 vis à vis d'un certain nombre de ces différentes espèces afin d'essayer de comprendre les mécanismes mis en jeu.

III-A REACTIVITE D'IRP1 VIS A VIS DES ESPECES OXYDANTES

III-A-1 Etude avec l'oxygène moléculaire

L'aconitase mitochondriale, notamment dans les nombreuses études rapportées par Beinert et coll. (pour revue Beinert *et coll.* 1996), a toujours été décrite comme étant sensible à la présence d'oxygène moléculaire, qui induit, en cours de purification, la formation d'une espèce contenant un centre [3Fe-4S] inactive.

La susceptibilité de la protéine rhIRP1, sous sa forme aconitase, vis à vis de l'oxygène moléculaire a donc été étudiée. Pour cela, 20 μ M de rhIRP1 dans 5 mM d'HEPES-OH pH 7.4 (concentration finale de citrate 20 μ M) ont été placés à l'air, en maintenant le micro-tube contenant la solution de protéine ouvert, à température ambiante. L'évolution de l'activité aconitase de la protéine a été suivie en dosant périodiquement cette activité avec un aliquote de la solution (Figure III-1).

La légère couleur observable à cette concentration n'évolue apparemment pas au cours de l'incubation, ni l'activité aconitase, même après 90 minutes.

L'absence de perte de l'activité aconitase, associée à la présence du centre [4Fe-4S] (Haile *et coll.* 1992a), permet de conclure que celui-ci n'est pas dégradé lors de l'exposition de rhIRP1 à l'oxygène. Le dosage de l'activité de fixation au motif IRE n'a donc pas été réalisé, puisque cette activité dépend du démantèlement complet de l'agrégat fer-soufre (Hirling *et coll.* 1994, Philpott *et coll.* 1994).

La protéine rhIRP1 semble donc être plus résistante à l'oxygène que son homologue mitochondrial qui est inactivé, au moins par la génération de son centre [3Fe-4S]. Bien qu'il soit difficile de comparer des expériences faites dans des laboratoires différents et que nous n'ayons pas eu accès à des échantillons d'aconitase mitochondriale de qualité similaire à celle de rhIRP1 au cours de cette thèse, la moindre sensibilité de l'aconitase cytosolique vis à vis de l'oxygène a été indépendamment observée lors de la purification de la protéine IRP1 de foie

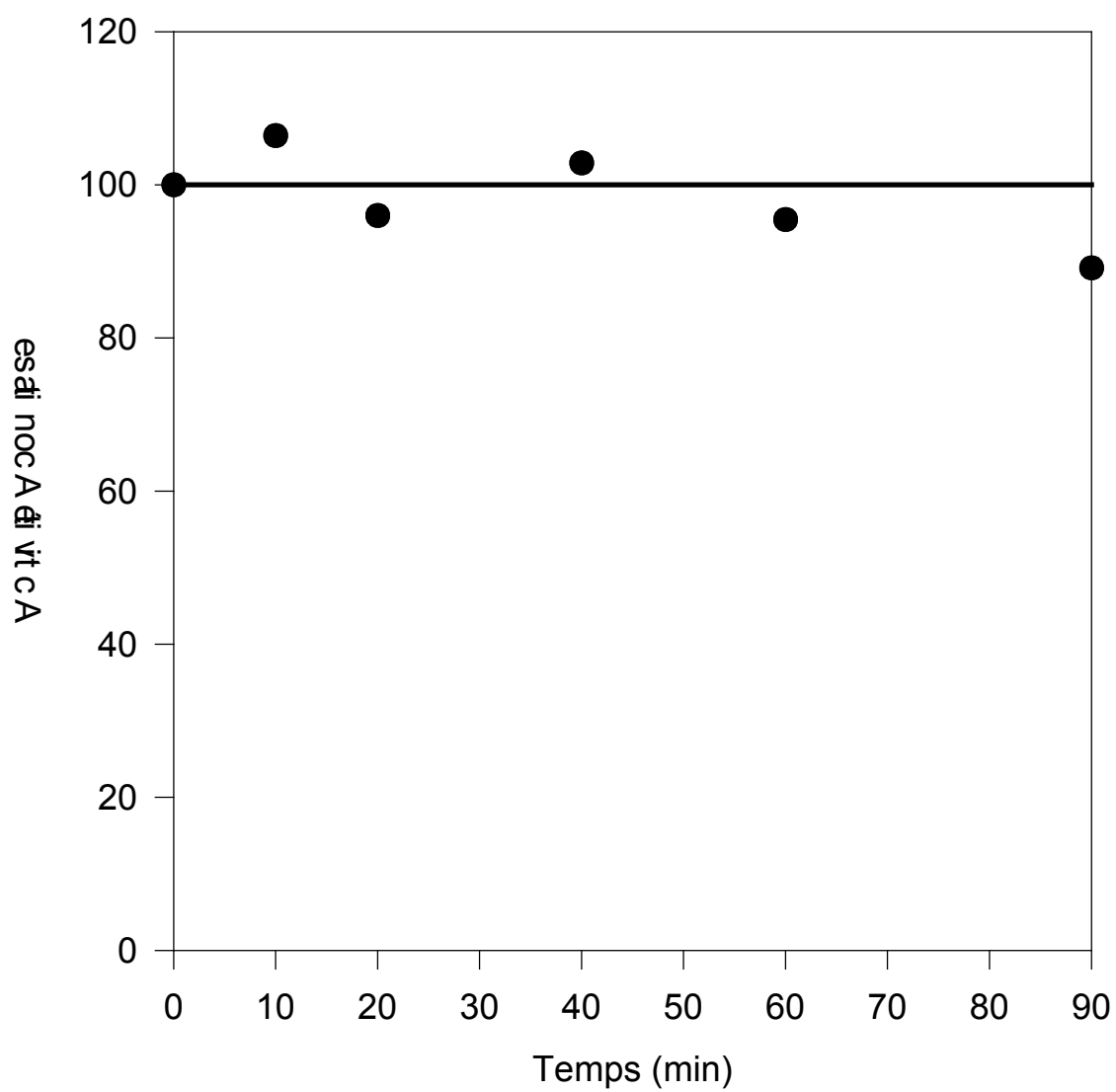


Figure III-1 : Evolution de l'activité aconitase d'aliquotes de 20 μ M de rhIRP1 en présence d'oxygène moléculaire.

de bœuf par Kennedy et coll. (Kennedy *et coll.* 1992). Ces auteurs ont observé une plus grande proportion d'aconitase cytosolique sous la forme [4Fe-4S] que lors de leurs purifications de l'homologue mitochondrial.

Néanmoins, cette insensibilité peut partiellement s'expliquer par la présence de substrat (citrate), provenant de la solution mère de protéine dans la solution d'incubation. En effet, ce dernier apporte une certaine résistance vis à vis de la destruction de l'agrégat fer-soufre, à la fois pour la protéine cytosolique (Haile *et coll.* 1992b), mais aussi son homologue mitochondrial (Zheng *et coll.* 1992a).

Comme la présence d'oxygène peut provoquer, par réduction partielle, la génération d'espèces dérivées plus réactives, les études sur la protéine rhIRP1 ont, malgré ce qui précède, systématiquement été réalisées en boîte à gants où la concentration d'oxygène n'excède pas 2 ppm (partie par million).

III-A-2 Etude avec l'ion superoxyde

Une de ces espèces générées par la réduction partielle de l'oxygène est l'ion superoxyde qui correspond à la réduction par un seul électron. Les sources biologiques d'ions superoxydes sont nombreuses, parmi lesquelles la NADPH oxydase dans les cellules impliquées dans la défense de l'organisme ou la chaîne respiratoire des mitochondries sont quantitativement importantes.

L'effet de l'ion superoxyde sur les protéines à centre fer-soufre, notamment la famille des déshydratases dont l'aconitase fait partie, a été décrit dans la littérature (Gardner et Fridovich 1991, Liochev et Fridovich 1993, Flint *et coll.* 1993, Brown *et coll.* 1995, Gardner 1997), avec l'observation systématique d'une inactivation des protéines par destruction de leur centre fer-soufre.

L'étude de la réaction de l'ion superoxyde avec la protéine rhIRP1 purifiée sous sa forme aconitase a donc été entreprise.

III-A-2-a Résultats

Dans un premier temps, une solution de superoxyde a été générée par le système enzymatique Xanthine/Xanthine Oxydase. La xanthine oxydase catalyse la formation d'acide urique et de superoxyde à partir de la xanthine en présence d'oxygène et d'eau (Equation III-1) (McCord et Fridovich 1969).



Pour cela, une solution de 500 μM d'hypoxanthine, un dérivé de la xanthine, a été traitée par 0.06 unité de xanthine oxydase de microorganisme pendant 15 minutes à 30°C à l'air, puis conservé à 4°C avant utilisation pour éviter la dismutation spontanée du superoxyde.

10 μl de la solution de superoxyde ont été ajoutés à 15 μl de 20 μM de rhIRP1, pour une concentration finale de protéine 12 μM , et l'ensemble a été incubé 15 minutes à 30°C avant que l'activité aconitase ne soit mesurée (Figure III-2). Celle-ci est complètement perdue dans ces conditions.

Le produit généré par cette réaction enzymatique inactive donc de manière efficace l'activité aconitase de la protéine IRP1, mais il n'est pas pur, notamment une quantité non négligeable de peroxyde d'hydrogène est générée (Equation III-2).



De plus la concentration de superoxyde généré n'est pas facile à contrôler. Nous avons donc préparé une quantité de KO_2 connue juste avant réaction pour comparaison. Le KO_2 est un composé très instable en solution neutre et acide, qui a été dissous dans 10 mM de NaOH.

A l'abri de l'oxygène, 100 μl de 20 μM de rhIRP1 dans 50 mM Tris-Cl pH 7.4 ont été mis en présence de 0.02 unité/ μl de catalase de foie de bœuf (Sigma), afin d'éviter un effet de l'eau oxygénée générée par la dismutation spontanée du superoxyde, puis 1 μl de 10 mM KO_2 ,

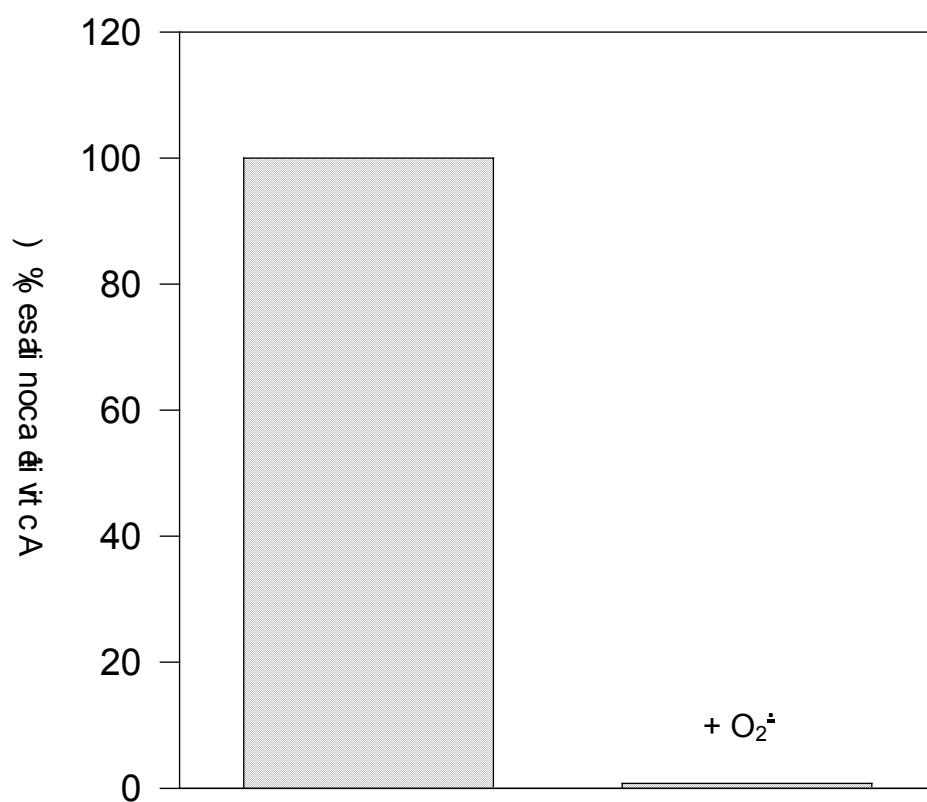


Figure III-2 : Effet de l'ajout d'une solution de superoxyde (Hypoxanthine/Xanthine Oxydase) sur l'activité aconitase de rhIRP1.

préparé extemporanément dans NaOH 10 mM a été ajouté, pour une concentration finale théorique de 100 μM de KO_2 . Différents aliquotes de la réaction ont été prélevés en cours de réaction et leur activité aconitase a été dosée pour juger de l'intégrité du centre fer-soufre (Figure III-3).

En présence de catalase, l'activité aconitase de la protéine n'évolue pas durant les 15 minutes d'incubation, puis on observe une légère chute de l'activité aconitase lors de l'ajout de la solution de KO_2 et une stabilisation de cette activité, aux alentours de 80% de l'activité aconitase initiale.

Une nouvelle solution de 5 mM de KO_2 a été préparée et ajoutée au mélange, portant la concentration finale de KO_2 de 200 μM (Figure III-3).

De nouveau une baisse de l'activité aconitase est visible suite à cet ajout et cette activité se stabilise vers 50% de l'activité aconitase initiale.

III-A-2-b Discussion

Que ce soit par génération enzymatique ou chimique, le superoxyde est toujours capable d'inhiber l'activité aconitase de la protéine IRP1. La vitesse de formation du superoxyde, difficilement contrôlable avec le système enzymatique, a été légèrement mieux cernée à partir de KO_2 . Malgré deux ajouts successifs de 5 fois la stœchiométrie de superoxyde par rapport à la protéine, la totalité de l'activité aconitase n'a pas été perdue, très certainement à cause de la compétition entre dismutation rapide du superoxyde et réaction avec la protéine.

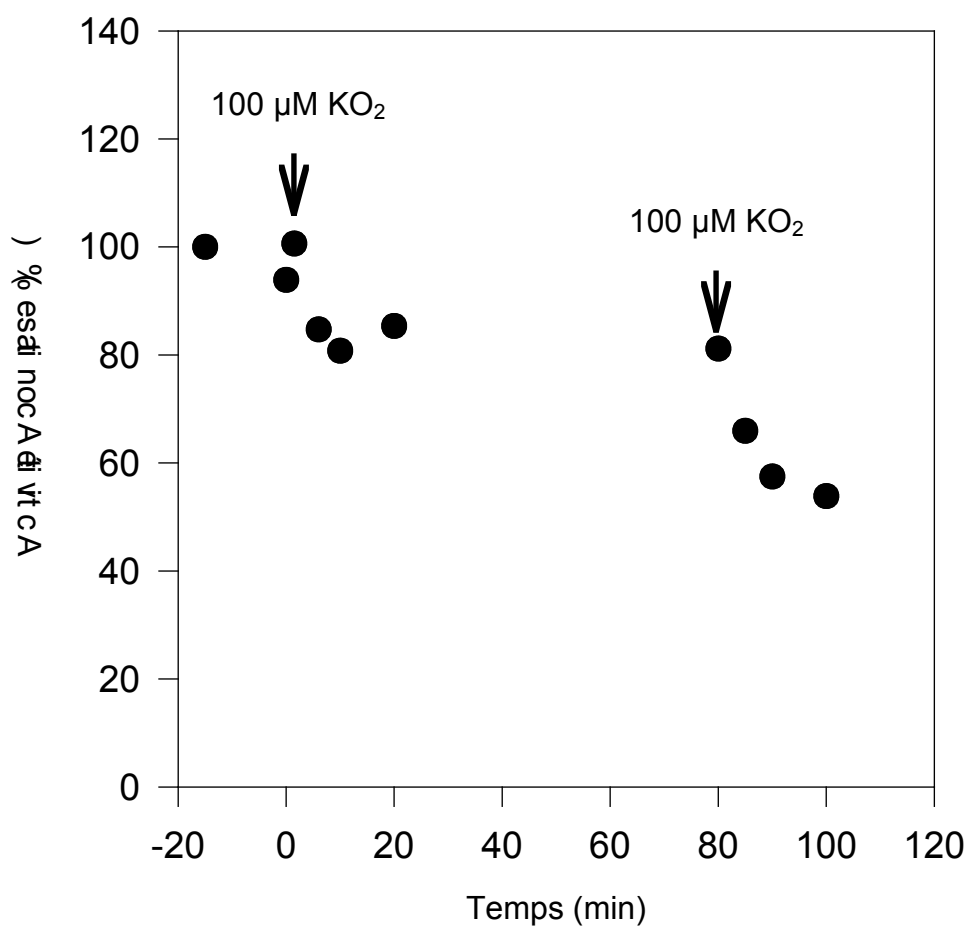
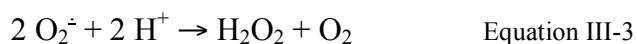


Figure III-3 : Evolution de l'activité aconitase d'aliquotes de 20 μ M rhIRP1 lors de l'ajout de 100 μ M de superoxyde (KO₂).

III-A-3 Etude avec le peroxyde d'hydrogène

Le superoxyde étudié précédemment se dismute pour former une molécule d'oxygène et une molécule de peroxyde d'hydrogène, en présence de protons (Equation III-3). *In vivo* cette réaction est catalysée par les enzymes superoxyde dismutases.



Le peroxyde d'hydrogène participe à de nombreux états de stress oxydant, notamment de par sa capacité à générer des radicaux hydroxyles en présence de métaux de transition à l'état réduit, comme le fer ferreux, par la réaction dite de Fenton (Equation III-4).



La réaction de réduction à 1 seul électron du peroxyde d'hydrogène par le fer ferreux, engendre un atome de fer ferrique et la rupture hétérolytique de l'eau oxygénée en une particule radicalaire, le radical hydroxyle, et un anion hydroxyle.

Le radical hydroxyle ainsi formé est une espèce très réactive capable de réagir avec les différents composants cellulaires (ADN, lipides, protéines, etc...). Les modifications de l'ADN peuvent générer des mutations quand elles surpassent les systèmes de réparation et l'action du radical hydroxyle sur les protéines provoque l'accumulation de protéines oxydées. Ces phénomènes participent à de nombreuses pathologies (Berlett et Stadtman 1997).

Le rôle du fer dans l'amplification de la réactivité du peroxyde d'hydrogène a poussé certaines équipes à étudier l'effet de cette espèce dérivée de l'oxygène sur le principal régulateur de son homéostasie, le système IRP/IRE. Ainsi, dans une étude avec des fibroblastes murins, une activation très rapide de l'activité de fixation au motif IRE des IRP est apparue lors de l'exposition des cellules à de faibles concentrations de peroxyde d'hydrogène (Pantopoulos *et coll.* 1997). Néanmoins la génération du peroxyde d'hydrogène à l'intérieur des mêmes cellules, par inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale à l'aide d'antimycine A (Boveris et Chance 1973), de même que le traitement direct des extraits cytosoliques (Pantopoulos et Hentze 1995), n'a pas permis d'observer une activation aussi

rapide des IRP. Dans le même temps, une autre étude a démontré que, contrairement aux extraits des fibroblastes murins (Pantopoulos et Hentze 1995), des extraits de foie de rat voyaient leur IRP s'inactiver pour leur fixation au motif IRE suite à un traitement par le peroxyde d'hydrogène (Cairo *et coll.* 1996). Les auteurs en ont déduit une oxydation des cystéines nécessaires à la liaison de l'ARN et un moyen de limiter la situation de stress en bloquant le système IRP/IRE, donc en permettant la synthèse de ferritine et en limitant l'apport extérieur de fer via l'endocytose de la transferrine.

Devant ce constat, contradictoire, concernant la capacité du peroxyde d'hydrogène d'influer sur l'activité d'IRP1, la réactivité de cette espèce réactive de l'oxygène a été étudiée directement sur la protéine purifiée rhIRP1.

III-A-3-a Résultats

Avant toute étude, la solution de peroxyde d'hydrogène a été systématiquement purifiée sur une résine échangeuse d'ions (AG 501-X8 / Biorad). Cette résine est composée d'un mélange de la phase échangeuse d'anions de type AG 1-X8 et de la phase échangeuse de cations de type AG 50-X8. Cette résine, équilibrée avec de l'eau ultra pure, permet d'obtenir une solution de peroxyde d'hydrogène débarrassée à la fois des cations et des anions qu'elle contient, et en particulier des ions superoxydes.

La solution de peroxyde d'hydrogène ainsi purifiée est dosée par spectrophotométrie en utilisant un coefficient d'extinction molaire moyen de $40 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ à 240 nm (Nelson et Kiesow 1972). Elle est conservée dans la glace et à l'abri de la lumière afin de minimiser sa décomposition, tout en évitant les délais entre sa préparation et son utilisation.

III-A-3-a-i Evolution de l'activité aconitase

Comme précisé plus haut, la réactivité de rhIRP1 avec H_2O_2 a été étudiée en absence d'oxygène dans une enceinte assurant une concentration inférieure à 2ppm. 20 μM de rhIRP1 dans 20 mM Tris-Cl pH 7.4 ont été incubés avec 100 μM d'eau oxygénée à température ambiante. Le suivi de l'évolution de l'activité aconitase a été effectuée en dosant différents aliquotes prélevés à intervalles réguliers, toujours en absence d'oxygène (Figure III-4).

On observe une diminution rapide et monophasique de l'activité aconitase ; celle-ci est quasiment nulle après 40 minutes d'incubation.

III-A-3-a-ii Evolution de l'activité de fixation au motif IRE

Cette perte d'activité aconitase montre que l'agrégat [4Fe-4S] de rhIRP1 est probablement modifié lors de l'incubation avec le peroxyde d'hydrogène. Comme il a été démontré *in vivo* que l'incubation de cellules avec de faibles concentrations de peroxyde d'hydrogène permet l'activation des IRP pour la fixation au motif ARN (Pantopoulos *et coll.* 1997), nous avons dosé l'activité de fixation aux IRE d'aliquotes prélevés au cours de l'incubation (Figure III-5).

Avant réaction (Figure III-5, puits B), aucune bande retardée n'est visible en absence de 2ME. Ceci s'explique par le fait que rhIRP1 est initialement sous sa forme aconitase [4Fe-4S] et ne peut donc fixer l'ARN. Cependant l'ajout de 2% de 2ME permet de révéler une forte bande retardée (Figure III-5, puits A). Les aliquotes prélevés en cours de réaction voient leur activité aconitase diminuer mais ne permettent pas d'observer l'apparition d'une bande retardée par incubation avec le motif IRE de la chaîne H de la ferritine humaine (Figure III-5, puits C à F). Pourtant, le dosage du dernier aliquote, correspondant à 90 minutes de réaction avec le peroxyde d'hydrogène, permet la révélation d'une bande retardée en présence de 2% de 2ME (Figure III-5, puits G) d'une intensité comparable à celle observée avant réaction.

Ainsi la disparition de l'activité aconitase de la protéine IRP1 lors du traitement avec le peroxyde d'hydrogène n'est pas associée à une apparition de l'activité de fixation au motif IRE. Donc la forme [4Fe-4S] de la protéine n'est pas transformée en une forme sans métal capable de fixer l'ARN. Néanmoins la possibilité de révéler l'activité de fixation au motif IRE par 2% de 2ME après 90 minutes d'incubation permet de conclure que la protéine n'est pas inactivée de manière irréversible par ce traitement, mais seulement qu'elle existe sous une forme inactive à la fois comme aconitase et comme protéine fixatrice du motif IRE.

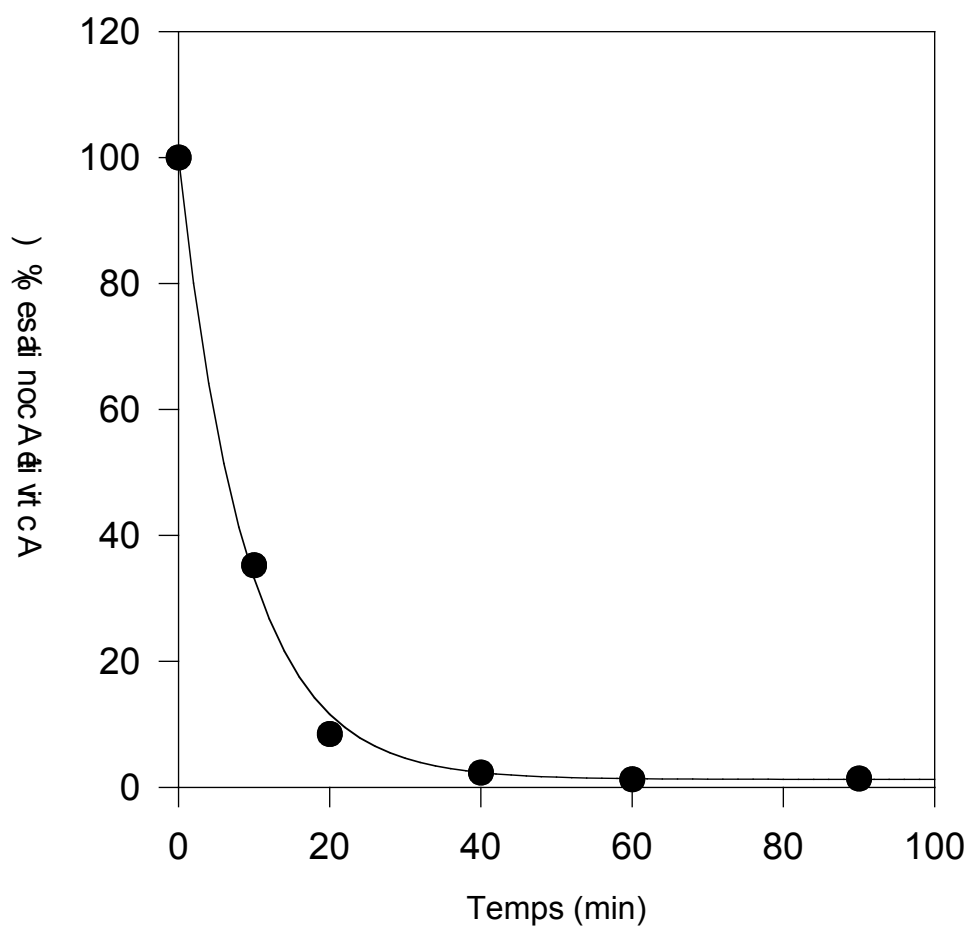


Figure III-4 : Evolution de l'activité aconitase des aliquotes de 20 μ M de rhIRP1 incubés en présence de 100 μ M de H_2O_2 à l'abri de l'oxygène.
 ligne continue : fit de la décroissance de l'activité (demi-vie \sim 6 minutes)

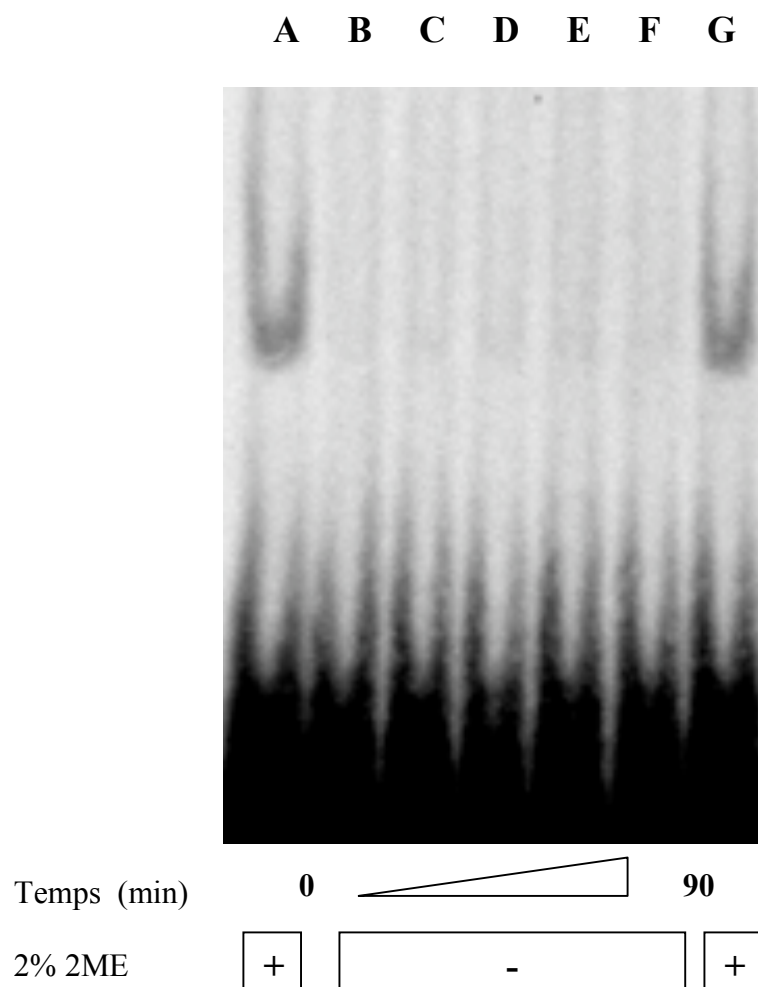


Figure III-5 : Evolution de l'activité de fixation au motif IRE d'aliquotes de 20 μ M de rhIRP1 traitée par 100 μ M de H_2O_2 .

D'autres états de la protéine IRP1 que les formes aconitase [4Fe-4S] ou fixatrice du motif IRE ont été proposés:

- Dans la forme totalement démétaillée, les cystéines indispensables à la fixation de l'ARN (Philpott *et coll.* 1993) peuvent s'oxyder. La réduction de ces résidus étant nécessaire à la liaison à l'ARN (Hentze *et coll.* 1989), cette oxydation peut expliquer l'absence d'activité de fixation au motif IRE.
- L'agrégat [4Fe-4S] peut être partiellement dégradé, en centre [3Fe-4S] par exemple. Une telle forme de la protéine a déjà été rapportée (Kennedy *et coll.* 1992 et Chapitre II-A-3) et elle ne présente ni activité aconitase, ni activité de fixation au motif IRE.

Ces différentes formes d'IRP1 impliquent le démantèlement plus ou moins important de l'agrégat fer-soufre. Le devenir de celui-ci, lors de l'incubation avec le peroxyde, a donc été étudié.

III-A-3-a-iii Evolution du centre fer-soufre de la protéine

Spectroscopie UV-Visible

Dans un premier temps, un spectre d'absorbance UV-visible de 20 μ M de rhIRP1 dans 20 mM Tris-Cl pH 7.4 a été comparé à celui enregistré 90 minutes après l'ajout de 100 μ M de peroxyde d'hydrogène. La couleur brune initiale n'évolue apparemment pas au cours de la réaction, mais le spectre visible et proche UV change un peu : le spectre de différence entre les échantillons après et avant réaction (résultats non montrés), montre deux maxima à 335 et à 485 nm.

Cette différence est très similaire à celle calculée entre les spectres de deux protéines à centre fer-soufre caractéristiques des formes [4Fe-4S] [3Fe-4S] et 2x[4Fe-4S], respectivement la ferrédoxine I d'*Azotobacter vinelandii* (Lutz *et coll.* 1983) et une ferrédoxine de *Clostridium pasteurianum* (Moulis et Meyer 1982).

Spectroscopie RPE

La même réaction entre 20 μM de rhIRP1 et 100 μM de peroxyde d'hydrogène a été suivie par RPE à 10 K (Figure III-6). Le signal caractéristique de la forme $[\text{3Fe-4S}]$ vers $g = 2$, initialement très faible, est observé après l'incubation et atteint un plateau quantifié à 1 spin par molécule de rhIRP1. Parallèlement, seule une très faible augmentation d'un signal haut spin du fer ferrique est observée à $g = 4.3$.

La solution a été traitée avec un excès de peroxyde d'hydrogène. Le traitement de 20 μM de rhIRP1 par 100 mM de peroxyde d'hydrogène conduit uniquement à la disparition complète du signal à $g = 2$, sans l'observation d'autres signaux RPE. Ainsi aucune autre espèce intermédiaire présentant un signal RPE n'est générée.

La formation du centre $[\text{3Fe-4S}]$ de la protéine IRP1, à partir de sa forme aconitase, $[\text{4Fe-4S}]$, est associée à la perte de fer de l'agrégat.

Apparition de fer chélatable

La libération de fer dans le milieu de réaction entre 20 μM de rhIRP1 et 100 μM de peroxyde d'hydrogène a été étudié, par l'utilisation de chélateurs du métal partiellement sélectifs de son état redox.

La ferrozine (3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenyl-sulfonic acid)-1,2,4-triazine) a été choisie pour sa capacité à lier préférentiellement le fer dans son état réduit ferreux (Fe^{2+}) en formant le complexe $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Fz})_3^{2+}$ qui présente un coefficient d'absorption élevé à 562 nm ($\epsilon=27900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Boyer *et coll.* 1988) en absence d'oxygène.

Au contraire, la desferrioxamine (Desferrioxamine mesylate) lie le fer préférentiellement dans son état oxydé ferrique ($K_a \sim 10^{30} \text{ M}^{-1}$, Neilands 1981). Le coefficient d'absorption du complexe à 428 nm ($\epsilon=2800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), bien que plus faible que celui du complexe entre ions

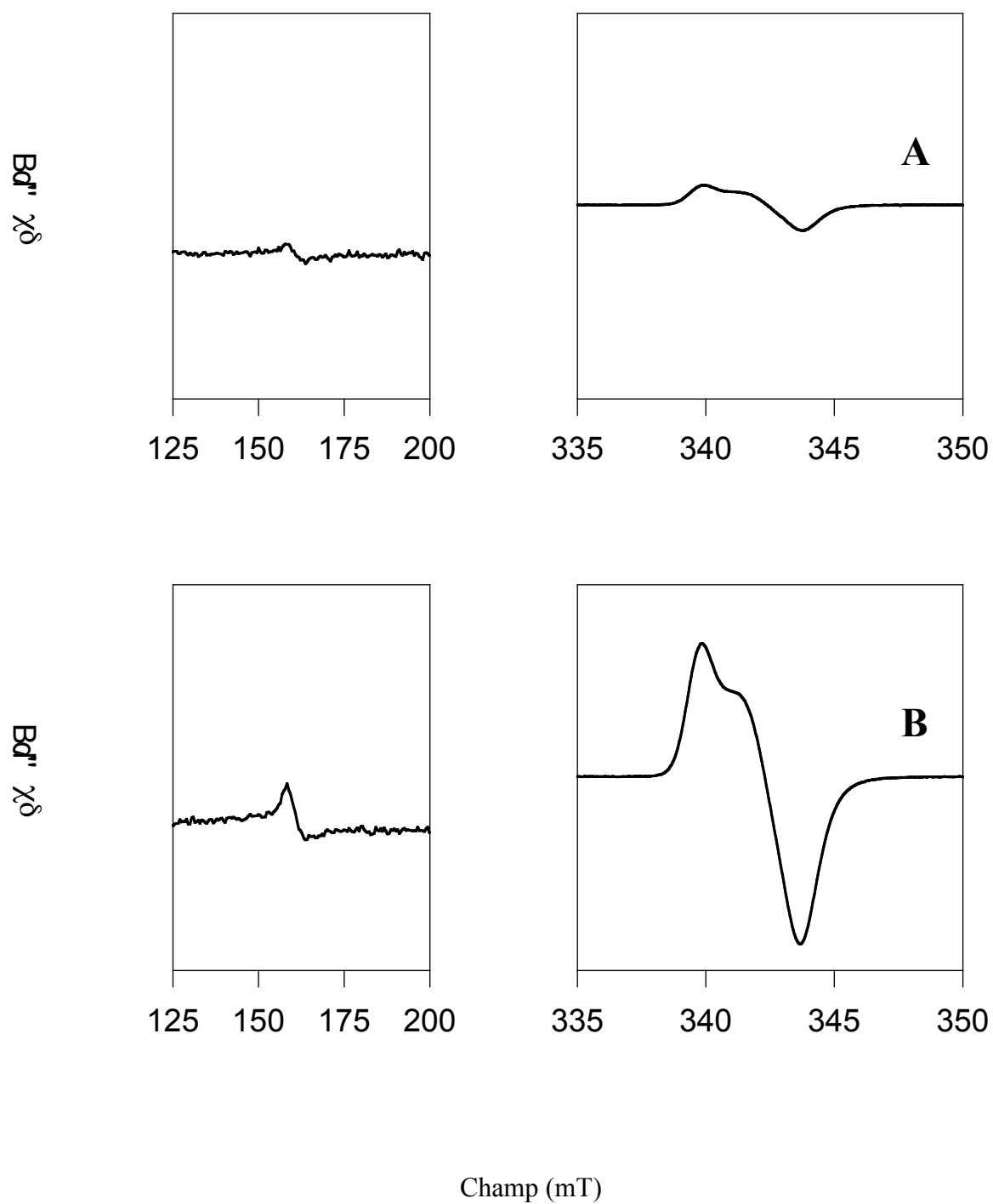


Figure III-6 : Signaux RPE (régions $g = 4.3$ et $g = 2$) de 20 μM de rhIRP1, avant (A) et après (B) 90 minutes d'incubation avec 100 μM de peroxyde d'hydrogène.

ferreux et ferrozine, permet aussi de mesurer la formation du complexe Fe(Desferrioxamine) (Gower *et coll.* 1989).

Un contrôle préliminaire a été effectué pour vérifier l'innocuité des chélateurs vis à vis de rhIRP1. Pour cela, 20 μ M d'IRP1 dans 20 mM Tris-Cl pH 7.4 ont été incubés, durant 15 minutes à l'abri de l'oxygène, en présence de 1 mM de chaque chélateur, représentant un excès de 50 fois la stœchiométrie par rapport à la protéine. L'activité aconitase finale a été mesurée et comparée à celle avant incubation avec les différents chélateurs (Figure III-7).

La protéine rhIRP1 conserve la totalité de son activité initiale aussi bien en présence de ferrozine qu'avec la desferrioxamine, ce qui prouve que ces chélateurs ne peuvent pas extraire l'agrégat fer-soufre, ou l'un de ses atomes, de la protéine IRP1.

Chélation par la ferrozine

Quand 20 μ M de rhIRP1, dans 20 mM Tris-Cl pH 7.4, sont mis à réagir avec 100 μ M de peroxyde d'hydrogène en présence de 500 μ M de ferrozine, l'absorbance à 562 nm augmente régulièrement (Figure III-8).

La concentration du complexe $\text{Fe}(\text{Fz})_3^{2+}$ déduite augmente donc concomitamment à la perte d'activité aconitase, dans une première partie de l'incubation. Un maximum de 0.8 atome de fer ferreux chélatable par protéine est atteint quand l'activité aconitase devient nulle, puis la concentration de complexe diminue légèrement quand l'incubation est prolongée. Cette légère diminution, ainsi que la sous-stœchiométrie Fe:IRP1, peuvent s'expliquer par l'oxydation du fer ferreux par l'excès de peroxyde d'hydrogène conduisant à la destruction ou au changement des propriétés spectroscopiques du complexe $\text{Fe}(\text{Fz})_3^{2+}$.

Chélation par la desferrioxamine

Une expérience similaire a été réalisée en présence de 500 μ M de desferrioxamine en suivant l'évolution de l'absorbance à 428 nm (Figure III-9).

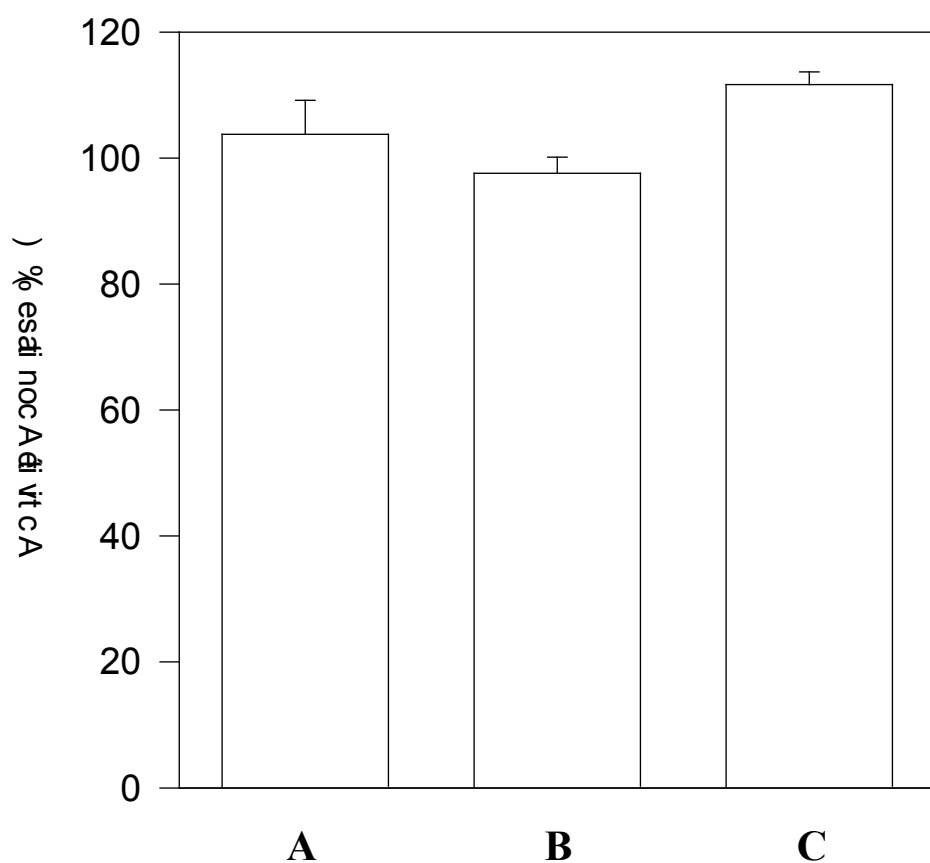


Figure III-7 : Effet de différents chélateurs de fer sur l'activité aconitase après réaction de 20 μ M de rhIRP1 avec A (aucun chélateur), B (1 mM ferrozine), C (1 mM desferrioxamine).

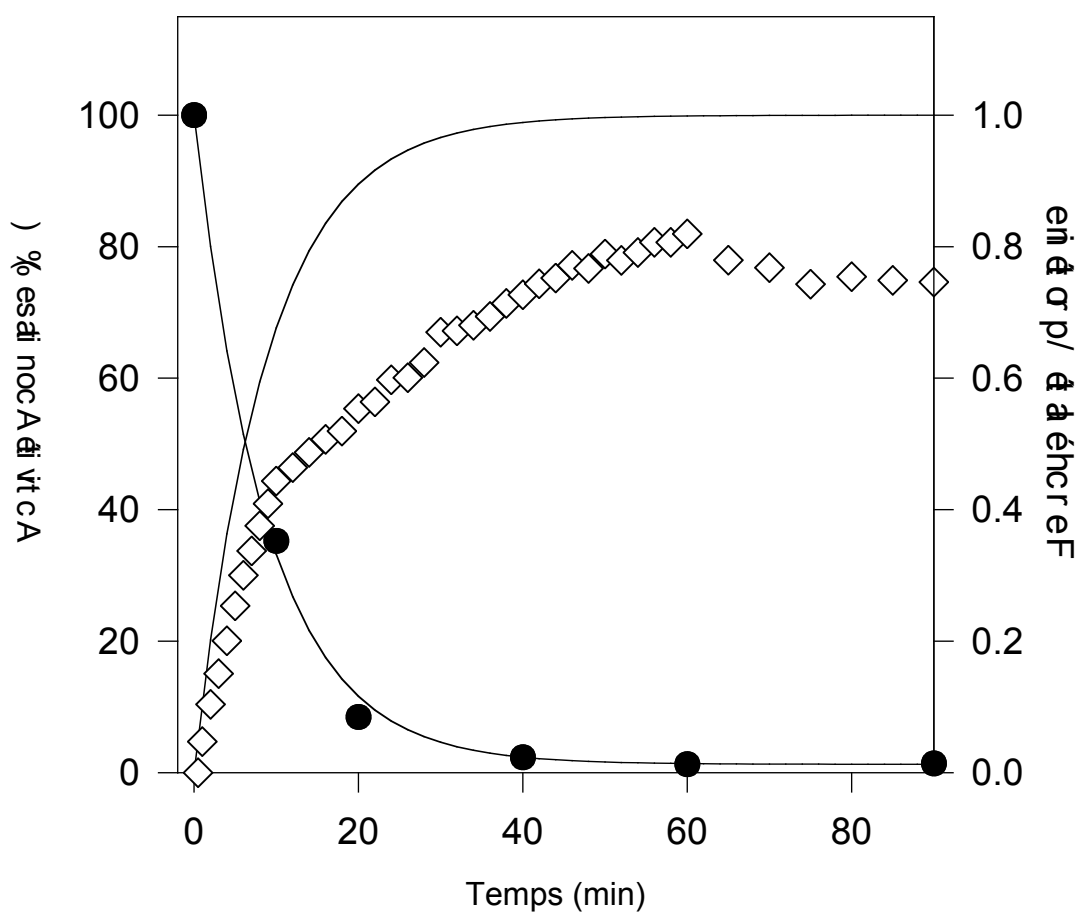


Figure III-8 : Chélation de fer par la ferrozine (losanges blancs) comparée à la perte d'activité aconitase (ronds noirs) lors de l'incubation de 20 μM de rhIRP1 en présence de 100 μM de peroxyde d'hydrogène. La courbe croissante correspond à l'inverse de la cinétique d'inactivation.

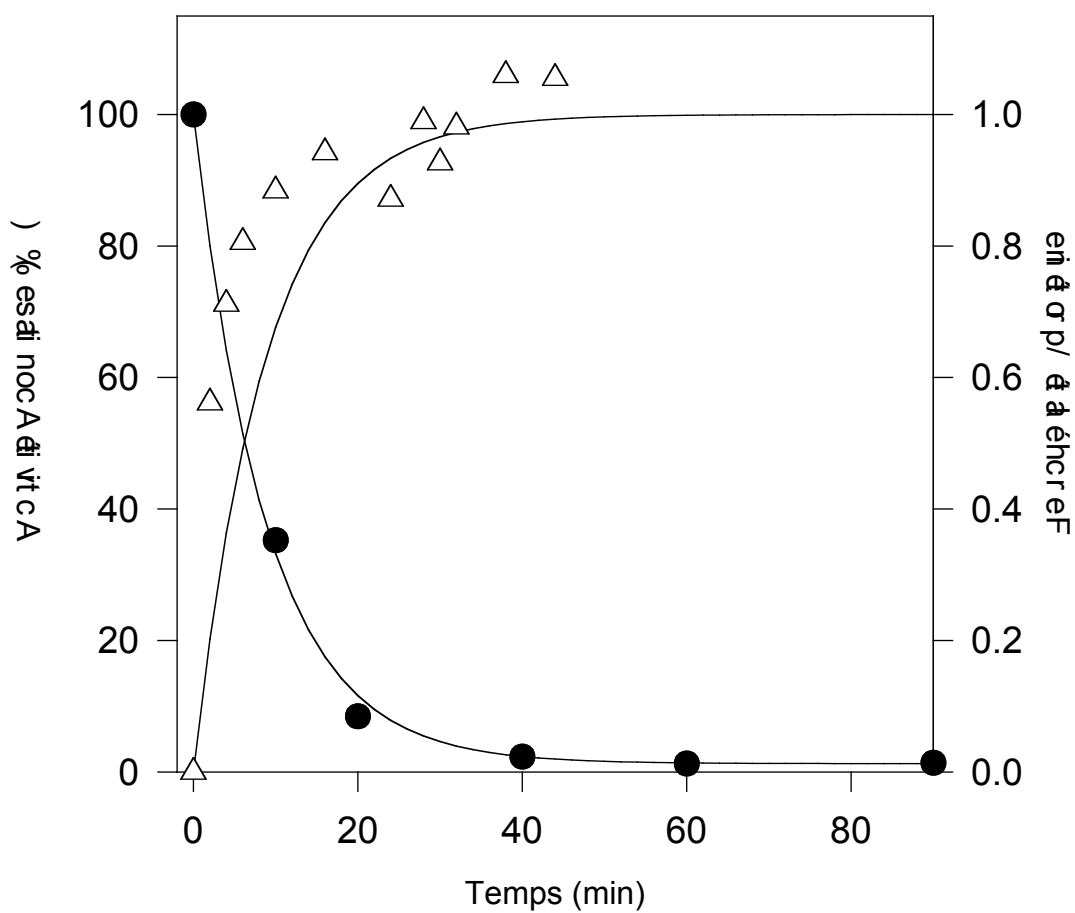


Figure III-9 : Chélation de fer par la desferrioxamine (triangles blancs) comparée à la perte d'activité aconitase (ronds noirs) lors de l'incubation de 20 μM de rhIRP1 en présence de 100 μM de peroxyde d'hydrogène. La courbe croissante correspond à l'inverse de la cinétique d'inactivation.

Le complexe Fe(Desferrioxamine) apparaît quand l'activité aconitase de la protéine rhIRP1 disparaît et atteint un plateau quantifié à 1 atome de fer ferrique libéré par molécule de rhIRP1.

De plus, l'ajout de ce chélateur a permis d'observer en RPE le signal du fer ferrique à $g = 4.3$ dont la cinétique d'apparition a été suivie (Figure III-10). Celle-ci est corrélée à l'apparition du complexe Fer/Desferrioxamine.

Ainsi l'incubation de 20 μM de rhIRP1 sous sa forme aconitase en présence 100 μM de peroxyde d'hydrogène conduit à la perte de l'activité aconitase, associée à l'agrégat $[4\text{Fe-4S}]$, et à la libération d'un atome de fer dans le milieu, qui peut être chélaté sous une forme ferreuse (ferrozine) ou ferrique (desferrioxamine). La protéine accommode alors un centre $[3\text{Fe-4S}]$ stable dont le signal RPE atteint un plateau à 1 spin/molécule.

Par analogie avec l'agrégat fer-soufre de l'aconitase mitochondriale (Robbins et Stout 1989), il est fortement probable que le fer libéré lors de cette réaction soit le Fe_a , l'atome de fer non lié à un résidu cystéine.

III-A-3-a-iv Implication du radical hydroxyle dans l'inactivation de rhIRP1

Les conditions expérimentales, et notamment la présence de fer ferreux indiquée par la formation du complexe avec la ferrozine, en présence de peroxyde d'hydrogène peuvent générer des radicaux hydroxyles. Cette possibilité, ainsi que l'implication d'une telle espèce dans l'inactivation de l'aconitase ont été étudiées.

Piégeage des radicaux dérivés de H_2O_2

Dans un premier temps la possibilité de génération du radical hydroxyle lors de la réaction entre $[4\text{Fe-4S}]$ -rhIRP1 et H_2O_2 a été vérifiée. Pour cela, le DEPMPO (Oxis International, Inc.) (Figure III-11) a été utilisé pour piéger les espèces radicalaires qui peuvent être formées dans la solution. Ce composé, une nitrone dérivée de la pyrroline 1-oxyde,

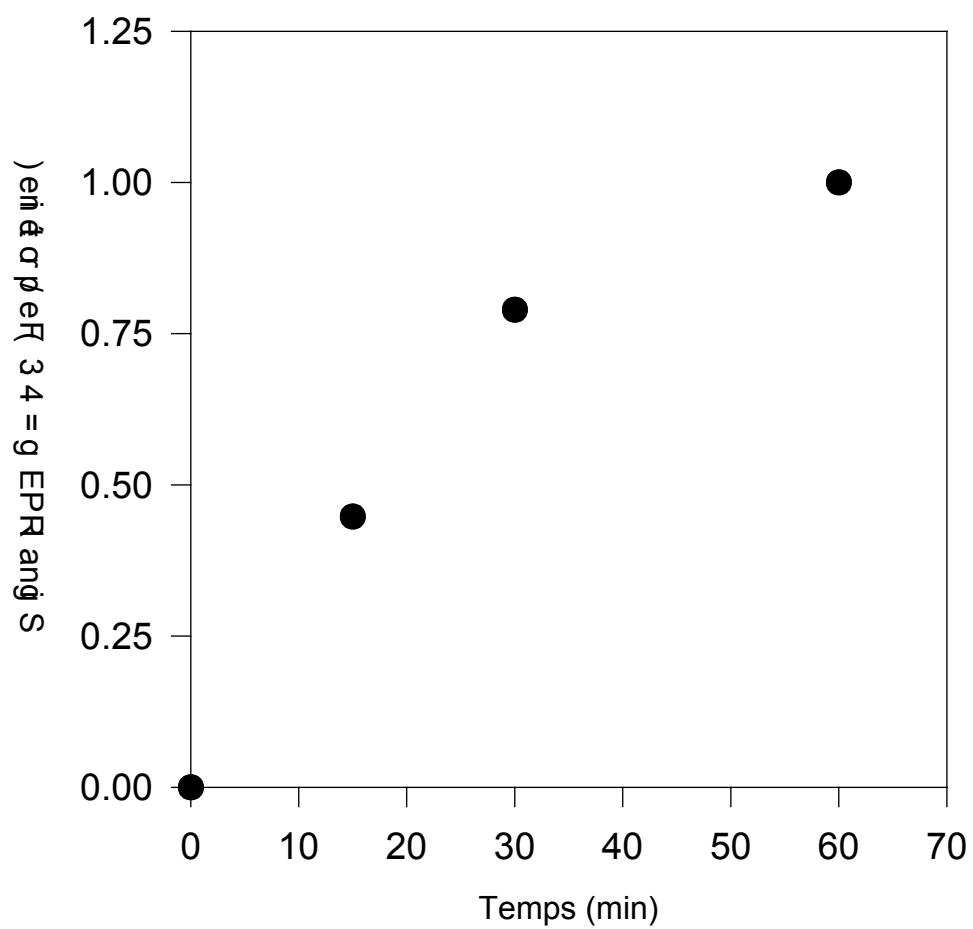


Figure III-10 : Cinétique d'apparition du signal RPE du fer ferrique à $g = 4.3$ lors de l'incubation de $20 \mu\text{M}$ de rhIRP1 en présence de $100 \mu\text{M}$ de H_2O_2 et $500 \mu\text{M}$ de desferrioxamine.

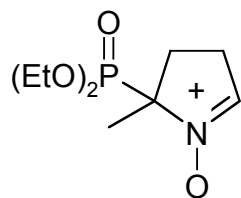


Figure III-11 : DEPMPO (5-(Diéthoxyphosphoryl)-5-méthyl-1-pyrroline N-Oxide)

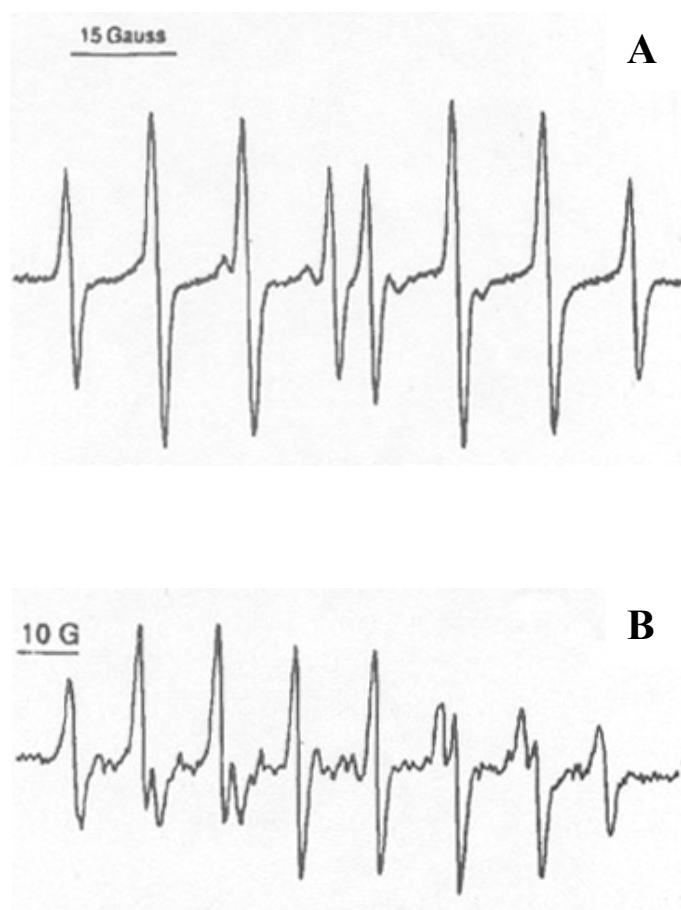


Figure III-12 : Spectres RPE des différents adduits du DEPMPO.

(A = DEPMPO-OH, B = DEPMPO-OOH)

(Fréjaville *et coll.* 1995)

présente la double caractéristique d'accroître la durée de vie des radicaux formés par fixation des radicaux oxygénés sur la position 2 de la pyrroline (demi-vie de 890 secondes) (Fréjaville *et coll.* 1995) par rapport aux piègeurs de spin usuels comme le DMPO (demi-vie de 50 secondes) (Fréjaville *et coll.* 1995), ainsi que celle de former deux adduits différenciables en RPE selon qu'il lie un superoxyde ou un hydroxyle (Fréjaville *et coll.* 1995).

- Quand le composé lie un radical hydroxyle, un signal RPE vers $g = 2$ caractéristique est observé (Figure III-12-A). Les constantes de couplage hyperfines de l'atome d'azote et de l'hydrogène- β étant proches, le signal est un quadruplet qui se scinde en deux quadruplets par couplage avec l'atome de phosphore.

- Au contraire, quand ce même composé lie le radical superoxyde, un autre signal RPE à $g = 2$ se présente comme un mélange de deux espèces de l'adduit, proposées comme étant, soit deux formes échangeables par protonation/déprotonation, soit deux conformères (Figure III-12-B).

20 μ M de rhIRP1 dans 20 mM Tris-Cl pH 7.4 a réagi avec 100 μ M de peroxyde d'hydrogène en présence de 100 mM de DEPMPO et la solution a été congelée après 10 minutes d'incubation dans un tube RPE. Les spectres ont été enregistrés à différentes températures.

A 10 K (Figure III-13-A) le spectre RPE est caractéristique de l'espèce [3Fe-4S] de la protéine IRP1 observé précédemment en absence de DEPMPO.

Afin de diminuer la contribution du signal RPE du centre [3Fe-4S] de la protéine qui relaxe très vite, un spectre a été enregistré à 86 K (Figure III-13-B). Il se caractérise par un signal complexe, correspondant à un mélange d'espèces.

A température ambiante, le spectre obtenu (Figure III-13-C), s'affranchissant complètement du signal [3Fe-4S]⁺, permet d'observer le spectre caractéristique d'un adduit

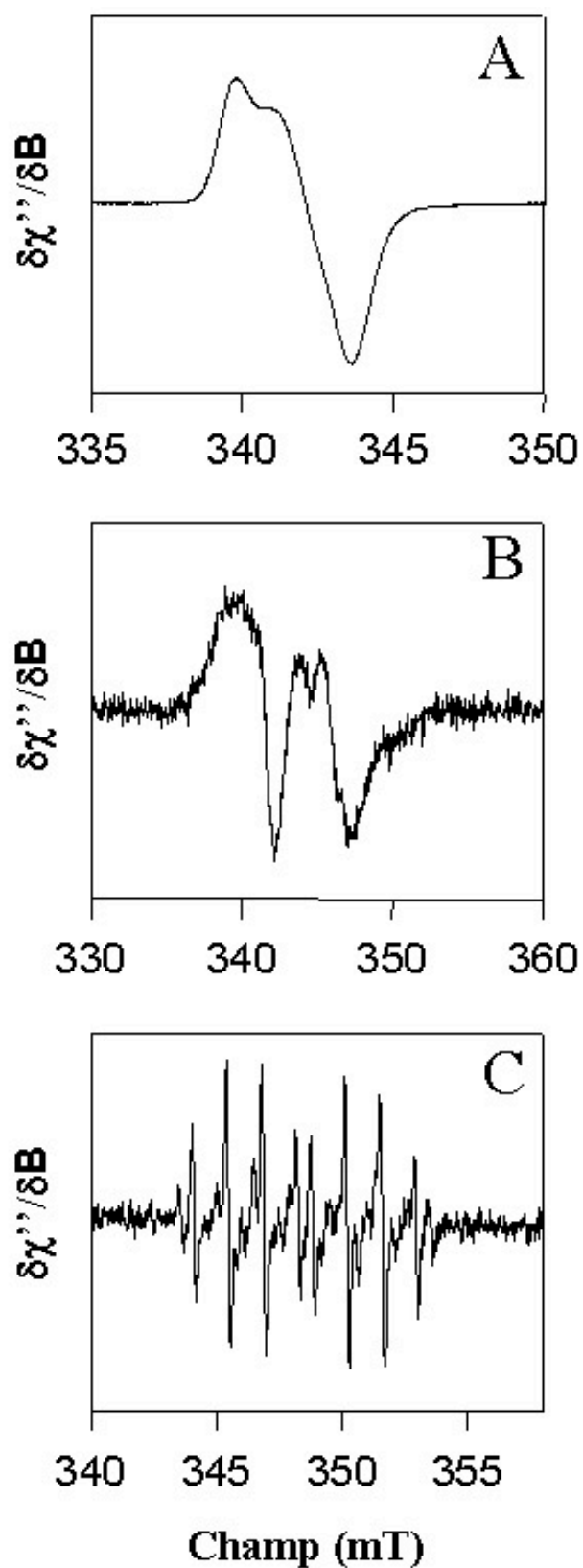


Figure III-13 : Spectres RPE en bande X de 20 μM de rhIRP1 incubée en présence de 100 μM de peroxyde d'hydrogène et 100 mM de DEPMPO.

A : Température 10K; Puissance 0.1 mW; Modulation 1 mT.

B : Température 86K; Puissance 2 mW; Modulation 0.7 mT.

C: Température 295K; Puissance 20 mW; Modulation 0.2 mT.

DEPMPO-OH correspondant au piégeage du radical hydroxyle; cette espèce est donc bien générée lors de l'incubation de la protéine rhIRP1 en présence de peroxyde d'hydrogène.

Réaction du radical hydroxyle avec rhIRP1

Afin d'étudier l'effet du radical hydroxyle dans l'inactivation de la forme aconitase de la protéine IRP1, la génération de ce composé a été favorisée par l'ajout de sulfate de fer ferreux lors de la réaction de la protéine en présence de peroxyde d'hydrogène.

20 μ M de rhIRP1 dans 20 mM Tris-Cl pH 7.4 ont préalablement été traités avec 35 et 50 μ M de sulfate de fer (ferreux). Puis chaque solution a réagi avec 100 μ M de peroxyde d'hydrogène et des aliquotes prélevés au cours de ces réactions ont été dosés pour leur activité aconitase. Les résultats ont été comparés à une expérience réalisée en absence de sulfate de fer (Figure III-14).

La perte d'activité aconitase induite par l'ajout de peroxyde d'hydrogène à rhIRP1 est inhibée par l'ajout de sulfate de fer ferreux en fonction de la concentration de ce dernier. La perte est quasiment nulle en présence de 50 μ M de sulfate de fer ferreux. Ce n'est donc pas le radical hydroxyle généré dans ces conditions qui inhibe l'activité aconitase de la protéine.

Un autre moyen de juger de la réactivité des radicaux hydroxyles est d'ajouter un piègeur de radical à la réaction. Pour cela le DMSO (dimethylsulfoxyde) a été utilisé. En effet, celui-ci réagit avec le radical hydroxyle pour générer du méthane et de l'acide méthane sulfonique (Babbs et Steiner 1990)

Nous avons contrôlé que 20 μ M de rhIRP1 dans 20 mM Tris-Cl pH 7.4 ne perdaient pas l'activité aconitase en présence de 100 mM de DMSO (Figure III-15). Quand 100 μ M de peroxyde d'hydrogène ont été ajoutés à cette réaction, l'activité aconitase a diminué rapidement et elle est devenue nulle après 90 minutes d'incubation (Figure III-15).

Ainsi, la génération du radical hydroxyle à partir du mélange entre sulfate de fer et peroxyde d'hydrogène, par la réaction de Fenton, n'augmente pas l'inhibition de l'activité de

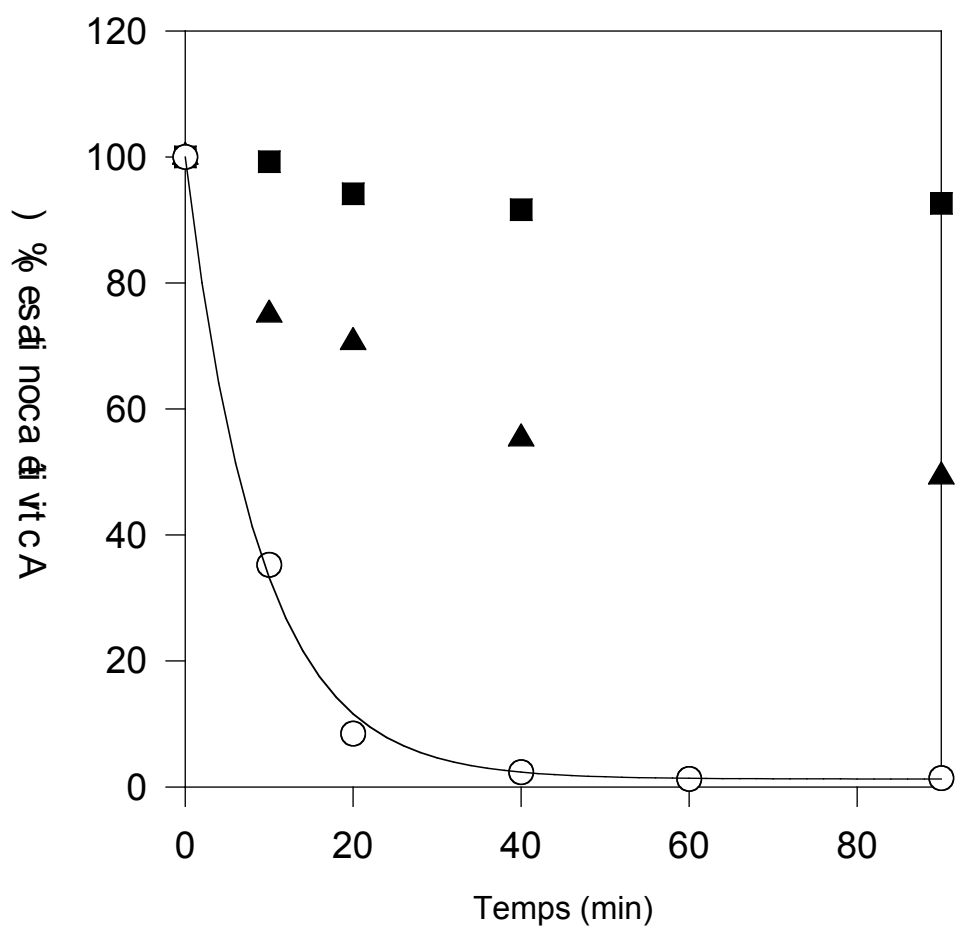


Figure III-14 : Effet de différentes concentration de sulfate de fer ferreux sur l'activité aconitase d'aliquotes de 20 μM de rhIRP1 en présence de 100 μM de peroxyde d'hydrogène.
(Ronds blancs = 0 μM , Triangles noirs = 35 μM et Carrés noirs = 50 μM).

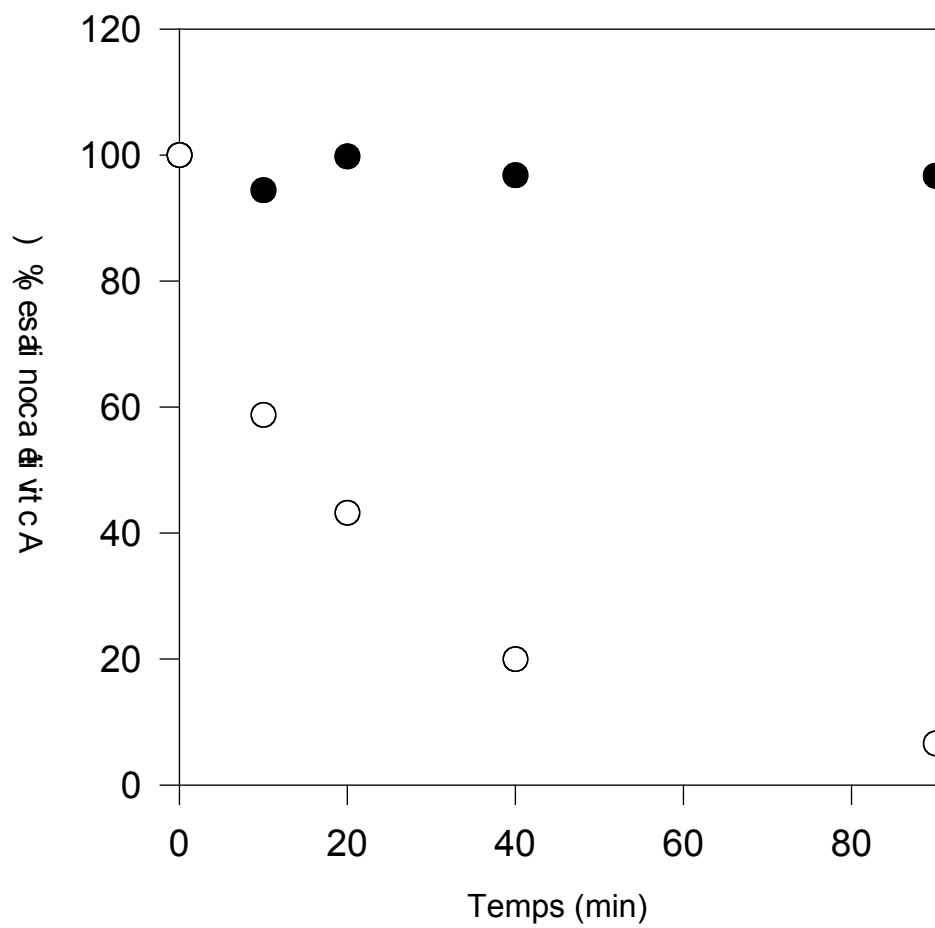


Figure III-15 : Effet de 100 mM de DMSO sur l'activité aconitase d'aliquotes de 20μM de rhIRP1.

(Ronds noirs = rhIRP1 seule, Ronds blancs = en présence de 100 μM de H₂O₂)

rhIRP1, mais, au contraire, empêche cette inhibition. On peut proposer que le fer ajouté consomme le peroxyde d'hydrogène en le réduisant, ou qu'il supplée la perte se produisant au niveau du centre [4Fe-4S]. En accord avec ces résultats, le DMSO, même s'il peut diminuer la réactivité des ions hydroxyles, n'influe pas sur la réaction entre rhIRP1 et peroxyde d'hydrogène. Ainsi, l'inactivation de l'aconitase observée lors de l'incubation en présence de peroxyde d'hydrogène est bien due à ce composé, et non au radical hydroxyle qui est pourtant produit.

III-A-3-a-v Etat redox du fer libéré

La perte d'activité aconitase sous l'action d'un excès de 5 fois de peroxyde d'hydrogène s'accompagne de la libération d'un seul atome de fer (Figure III-8 et Figure III-9) qui provient de l'agrégat [4Fe-4S], puisque l'apparition du métal dans le milieu est associée à l'apparition du signal RPE du centre [3Fe-4S]. Cet atome a pu être chélaté, à la fois par la ferrozine et par la desferrioxamine, donc l'incertitude de son état d'oxydation lors de son extraction de l'agrégat demeure.

La production de radicaux hydroxyles dans le milieu au cours de la réaction (Figure III-13-C) implique une réduction du peroxyde d'hydrogène en présence de rhIRP1. La seule source de réducteur dans ce milieu provient de l'agrégat de rhIRP1. Comme il n'est pas établi qu'un agrégat puisse réduire le peroxyde d'hydrogène en radical hydroxyle, l'interprétation la plus plausible est que l'atome de fer extrait de l'agrégat $[4Fe-4S]^{2+}$ par le peroxyde d'hydrogène est un atome de fer ferreux. D'autres arguments confortent cette interprétation :

- La spectroscopie RPE ne montre que peu ou pas de signal à $g = 4.3$ (Figure III-6) après la réaction. Ceci démontre que le fer libéré est soit ferreux, soit que ce fer existe à l'état oxydé (ferrique) mais sous une forme dans laquelle plusieurs ions sont couplés anti-ferromagnétiquement, donc silencieux en RPE, comme dans le cas de certains oxydes de fer ferrique.

- La chélation de fer ferreux par la ferrozine lors de l'inactivation de la protéine par H_2O_2 sans réducteur ajouté, s'associe parfaitement avec l'apparition du signal RPE à $g = 2$ correspondant à l'agrégat [3Fe-4S] oxydé de la protéine.

- Seul l'ajout du chélateur desferrioxamine permet la révélation d'un intense signal RPE du fer ferrique à $g = 4.3$. Quand ce chélateur est ajouté après réaction entre H_2O_2 et rhIRP1, l'apparition du signal à $g = 4.3$ n'est pas instantanée, mais elle se produit après quelques minutes seulement.

-

Ainsi, le fer ferreux libéré de rhIRP1 convertit le peroxyde d'hydrogène en radical hydroxyl, identifié par piégeage avec le DEPMPO, et s'oxyde en fer ferrique, observé par la chélation avec la desferrioxamine en spectrophotométrie et en RPE à $g = 4.3$.

III-A-3-a-vi Réactivation de la forme générée par le peroxyde d'hydrogène

Afin de déterminer si la conversion de la forme aconitase $[4Fe-4S]$ de la protéine vers la forme $[3Fe-4S]$, sous l'action du peroxyde d'hydrogène, est réversible, la solution obtenue après réaction a été dessalée par gel filtration en tampon 20 mM Tris-Cl pH 7.4, afin d'éliminer tous les composés de faible poids moléculaire générés lors de la réaction avec le peroxyde d'hydrogène. L'activité aconitase de cette protéine après réaction et dessalage a été mesurée et représente moins de 10% de l'activité initiale observée avant réaction avec le peroxyde d'hydrogène. Néanmoins, le traitement de la protéine en présence d'un excès de réducteur et de sulfate de fer permet de récupérer près de la moitié de l'activité aconitase initiale (résultats non montrés), démontrant que l'atome de fer perdu lors de l'incubation avec le peroxyde d'hydrogène peut être ré-assemblé dans l'agrégat de la protéine.

III-A-3-b Discussion

L'aconitase cytosolique, IRP1 sous sa forme $[4Fe-4S]$, est donc inactivée par le peroxyde d'hydrogène, sans pour autant générer la forme pouvant réguler la traduction des ARN messagers.

L'inactivation de la forme [4Fe-4S] d'IRP1 par le peroxyde d'hydrogène conduit à la formation d'un centre [3Fe-4S]. Cette espèce est stable dans le temps malgré la génération de radicaux hydroxyles dans les conditions de réaction.

La formation de cette espèce [3Fe-4S], s'accompagne de la libération d'un atome de fer ferreux (Fe^{2+}).

Le mécanisme fait donc intervenir la modification du centre $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$, composé formellement de 2 atomes de fer ferreux (Fe^{2+}) et de 2 atomes de fer ferrique (Fe^{3+}), par la génération du centre $[\text{3Fe-4S}]^+$, détecté en RPE et formé de 3 atomes de fer ferrique (Fe^{3+}), et la libération d'un ion ferreux (Fe^{2+}) (Figure III-16). Au total, l'action du peroxyde d'hydrogène s'accompagne donc de l'oxydation d'un atome de fer ferreux du cluster en fer ferrique.

Un précédent mécanisme de réaction expliquant la destruction du centre [4Fe-4S] et la génération du centre [3Fe-4S] de l'aconitase mitochondriale lors de l'action du radical superoxyde (Flint *et coll.* 1993), propose le passage par un agrégat oxydé $[\text{4Fe-4S}]^{3+}$ instable. Un tel centre, de spin demi-entier ($S = 1/2$), n'a pas pu être détecté lors de nos expériences, peut être à cause d'une très courte durée de vie dans IRP1.

Le fer ferreux libéré peut réagir avec l'excès de peroxyde d'hydrogène dans le milieu et générer le radical hydroxyle. Récemment, une étude RPE de l'action du superoxyde sur l'aconitase mitochondriale (Vásquez-Vivar *et coll.* 2000) a conclu à la libération de fer ferreux par l'observation de la génération de radicaux hydroxyles grâce à l'utilisation du même piègeur de spin, le DEPMPO. Néanmoins aucune preuve supplémentaire, telle que la chélation spécifique d'ions ferreux dans le milieu, n'a été apportée.

Finalement, contrairement à ce qui a été décrit lors de l'incubation de cellules entières, l'inactivation de la protéine purifiée comme aconitase *in vitro* n'est pas associée à l'apparition de l'activité de fixation au motif IRE (Figure III-5).

Cette observation rejoint l'absence d'activation des IRP notée lors de l'addition directe de peroxyde d'hydrogène à des extraits cellulaires (Pantopoulos et Hentze 1995). Une interprétation a été émise et propose une cascade de transduction du signal, initiée par le

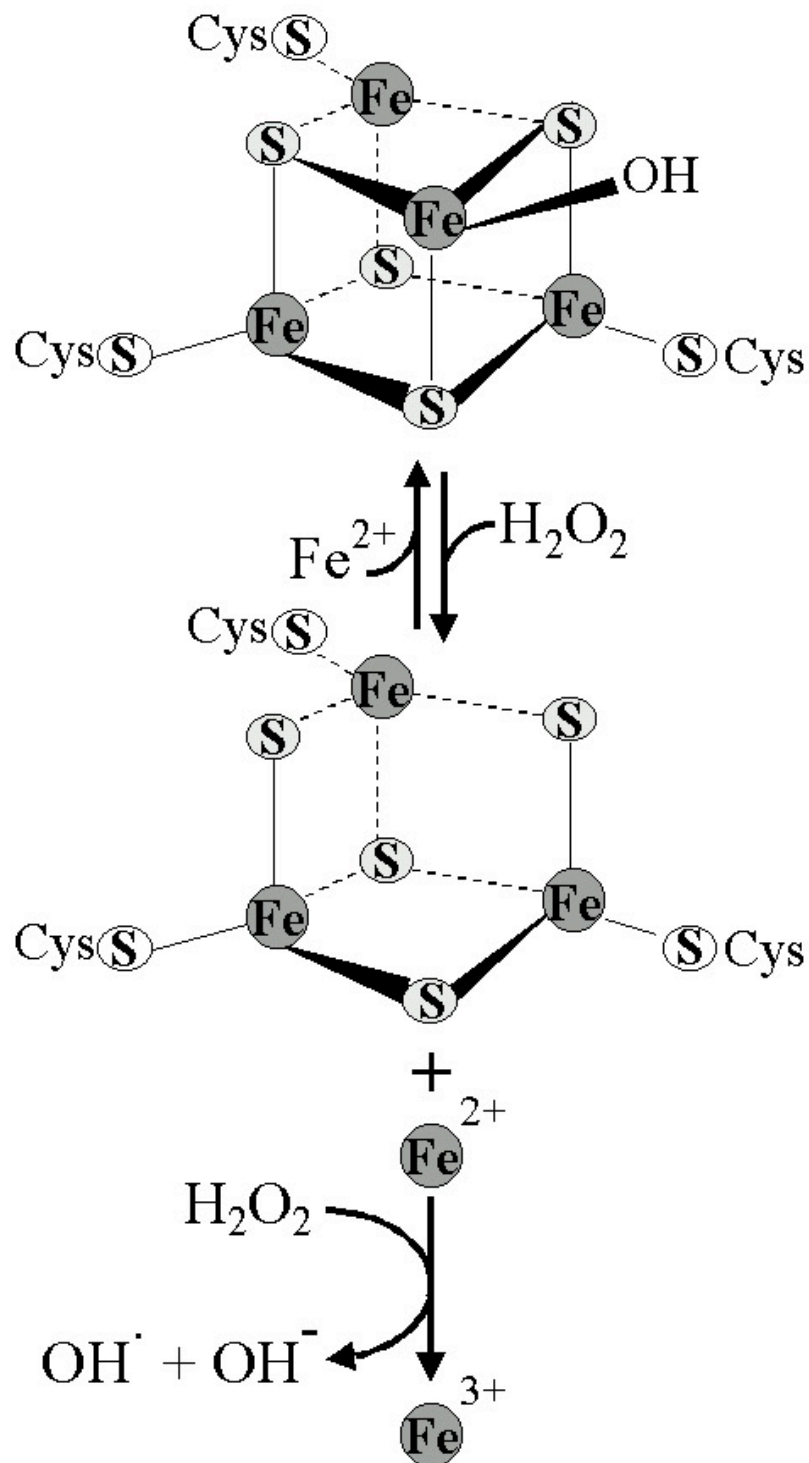


Figure III-16 : Représentation schématique de l'action du peroxyde d'hydrogène sur la forme aconitase de rhIRP1

peroxyde d'hydrogène, pour expliquer la différence d'activation des IRP et, notamment, la différence cinétique observée entre l'incubation extra-cellulaire et la génération intra-cellulaire du peroxyde d'hydrogène (Pantopoulos *et coll.* 1997).

Plusieurs résultats appuient cette hypothèse :

- Bien que ce résultat n'ait pas été confirmé par la suite, l'activation des IRP pour leur fixation au motif IRE grâce au peroxyde d'hydrogène extracellulaire a pu être inhibée par l'utilisation d'acide okadoïque (Pantopoulos et Hentze 1995). Ce composé inhibe les phosphatases de type I/IIa, deux enzymes majeurs catalysant la déphosphorylation des résidus sérine et thréonine dans les cellules de mammifères (Cohen *et coll.* 1990).
- Des liens entre les espèces réactives de l'oxygène et les phénomènes de transduction du signal par phosphorylation/déphosphorylation ont déjà été mis largement en évidence (Finkel 1998). Notamment, le peroxyde d'hydrogène peut activer les isoenzymes de la protéine kinase C (Konishi *et coll.* 1997).
- La protéine IRP1 a été décrite, *in vitro*, comme un substrat de la protéine Kinase C (Eisenstein *et coll.* 1993), même si la forme contenant le centre fer-soufre n'est pas la plus efficacement phosphorylée (Schalinske *et coll.* 1997), mais à ce jour, aucune preuve d'une telle phosphorylation *in vivo*, n'a pu être rapportée.
- Une étude (Pantopoulos *et coll.* 1996) a permis de montrer que l'activation extracellulaire des IRP pouvait se décomposer en deux phases : une phase d'activation où la présence de peroxyde d'hydrogène est nécessaire à l'activation, et une seconde phase, où le peroxyde peut être retiré du milieu de culture sans pour autant inhiber l'effet d'activation des IRP.
- Finalement, une autre expérience appuyant l'hypothèse d'une cascade de transduction d'un signal initiée par le peroxyde d'hydrogène a montré la possibilité de reproduire l'activation d'IRP1 d'un extrait cellulaire dans un système *in vitro* par

addition d'une fraction membranaire qui pourrait donc contenir un senseur d'H₂O₂ (Pantopoulos et Hentze 1998).

Néanmoins, malgré ces nombreux résultats concordant, les intermédiaires d'une telle cascade de transduction du signal n'ont toujours pas été déterminés.

III-A-4 Etude de l'oxygène singulet

Une autre espèce réactive de l'oxygène est la forme oxygène singulet qui correspond, non pas à une réduction, mais à un état excité de l'oxygène moléculaire. Celui-ci est majoritairement généré en biologie lors de réactions photochimiques impliquant le rayonnement UV-A (320-380 nm), et le rendement est fortement augmenté en présence de photosensibilisateurs (ou photoactivateurs). Dans les milieux biologiques, l'oxygène singulet réagit avec de nombreux composés tel que l'ADN, les protéines ou les lipides et génère divers dommages à l'origine du vieillissement, de certains cancers et autres effets cytotoxiques (Halliwell et Gutteridge 1999).

L'oxygène singulet peut aussi être produit dans les systèmes biologiques par différentes peroxydases, oxygénases, mais aussi lors de la réaction du peroxyde d'hydrogène en présence d'hypochlorite. (Ryter et Tyrrell 1998)

Récemment, des études concernant les effets d'irradiations UV-A sur l'état des IRP de différentes lignées cellulaires ont été publiées. Une première, utilisant des doses allant de 100 à 500 KJ/m² sur des fibroblastes primaires humains, a démontré que cette irradiation entraînait une augmentation de l'activité aconitase de IRP1, par libération de fer dans la cellule via la protéolyse de la ferritine (Pourzand *et coll.* 1998). A l'opposé, une étude basée sur l'irradiation de kératinocytes humains avec des doses plus faibles (jusqu'à 300 KJ/m²), a rapporté une inhibition de l'activité aconitase de IRP1 (Giordani *et coll.* 1998), associé à une inactivation irréversible de l'activité de fixation au motif IRE (Giordani *et coll.* 2000).

Les effets de l'irradiation UVA passent souvent par ceux de l'oxygène singulet. Une étude de la réactivité de cette espèce excitée de l'oxygène moléculaire sur [4Fe-4S]-rhIRP1 a donc été initiée.

III-A-4-a Résultats

III-A-4-a-ii Effet sur l'activité aconitase de rhIRP1

L'oxygène singulet a été généré à l'aide de l'endoperoxyde (DHPNO₂) d'un dérivé du naphthalène, le N,N'-di(2,3-dihydroxypropyl)-1,4-naphthalenedipropanamine (DHPN) (Martinez *et coll.* 2000, don du Dr J-L. Ravanat (DRFMC-SCIB-LAN, CEA-Grenoble, France). Cet endoperoxyde, stable à basse température, se dégrade lors de son incubation à 37°C, en générant le dérivé de naphthalène (DHPN) et en libérant 0.6 molécule d'oxygène singulet (¹O₂) et 0.4 molécule d'oxygène triplet (³O₂) par molécule de DHPNPO₂ (Figure III-17) (Martinez *et coll.* 2000).

Dans un protocole similaire à celui suivi avec le peroxyde d'hydrogène, 15 µM de rhIRP1 dans 20 mM Tris-Cl pH 7.4 ont été traités avec différentes concentrations de DHPNO₂ (1, 5 et 10 mM), et incubés à 37°C. L'évolution de l'activité aconitase a été suivie en prélevant et en dosant l'activité aconitase de différents aliquotes au cours de l'incubation (Figure III-18).

L'activité aconitase diminue avec la présence de DHPNO₂ et d'autant plus rapidement que la concentration en DHPNO₂ est élevée. Cette activité est presque nulle après 1 heure d'incubation avec 10 mM d'endoperoxyde.

Un contrôle a été effectué en incubant la protéine dans des conditions similaires avec 10 mM de DHPN, généré par le traitement du DHPNO₂ une nuit à 37°C. Aucune évolution de l'activité aconitase n'est observée, démontrant bien la non-réactivité du produit dérivé du naphthalène (résultats non montrés).

L'oxygène singulet libéré lors de la réaction pourrait générer, par réduction, des dérivés de l'oxygène tels que l'ion superoxyde ou le peroxyde d'hydrogène qui réagissent avec la protéine IRP1 (cf chapitres III-A-2 et III-A-3). L'implication de ces dérivés dans la réactivité du DHPNO₂ a été mesurée par l'incubation de 15 µM de rhIRP1 dans 20 mM Tris-Cl pH 7.4 avec 10 mM de DHPNO₂ en présence de 5 unités de superoxyde dismutase d'érythrocytes bovins et 5 unités de catalase de foie de bœuf. Ces enzymes ne modifient pas la décroissance de l'activité aconitase mesurée en leur absence (résultats non montrés).

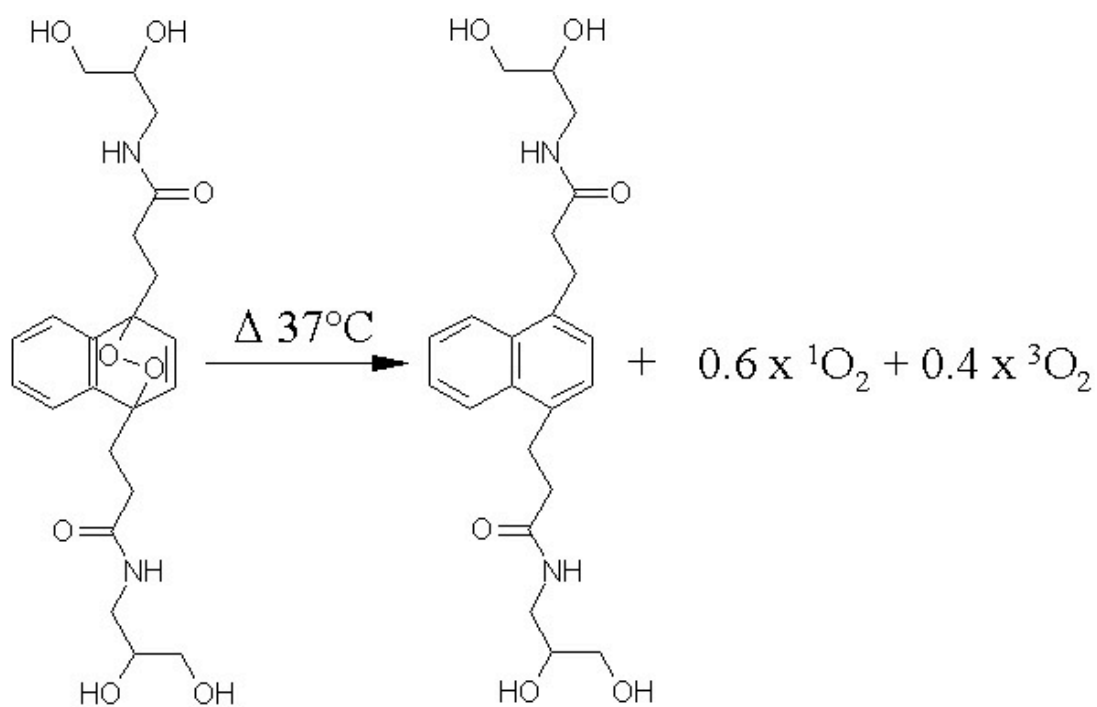


Figure III-17 : Réaction de formation de l'oxygène singulet à partir de l'endoperoxyde DHPNO₂

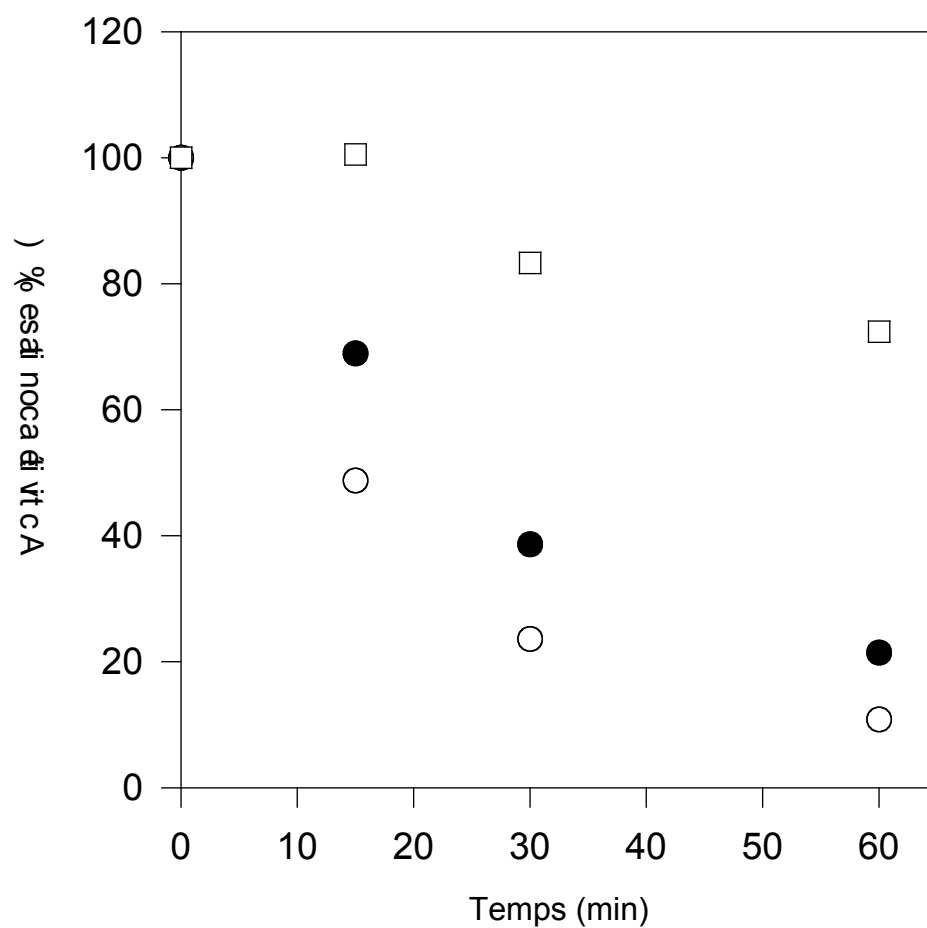


Figure III-18 : Effet de différentes concentration de DHPNO₂ sur l'activité aconitase d'aliquotes de 20 μ M de rhIRP1.

(Carrés blancs = 1 mM , Ronds noirs = 5 mM, Ronds Blancs = 10 mM).

Ceci confirme que c'est bien l'oxygène singulet libéré du DHPNO₂ qui inhibe l'activité aconitase de la protéine et non une espèce réactive de l'oxygène provenant de ce même oxygène singulet.

III-A-4-a-ii Effet sur l'activité de fixation au motif IRE de rhIRP1

Afin de mieux caractériser la réactivité de l'oxygène singulet, l'activité de fixation au motif IRE d'un aliquote ayant réagit avec 10 mM de DHPNO₂ pendant une heure a été mesurée. (Figure III-19).

En absence de 2ME (Figure III-19, puits C), la bande retardée présente une intensité identique à celle obtenue lors du dosage en absence de 2ME de la protéine avant incubation avec l'endoperoxyde (Figure III-19, puits A), démontrant que l'activité de fixation au motif IRE n'est pas révélée dans les conditions de l'expérience. Pourtant, en présence de 2% de 2ME, une bande retardée de forte intensité est présente (Figure III-19, puits B), démontrant que la protéine n'est pas irréversiblement inactivée.

Comme pour la précédente étude avec le peroxyde d'hydrogène, l'oxygène singulet agit sur la protéine [4Fe-4S] IRP1 en inactivant l'enzyme mais sans pour autant activer la protéine pour sa fixation au motif IRE.

L'évolution du centre fer-soufre de la protéine a donc été étudiée par spectroscopie RPE. Pour cela, 15 µM de rhIRP1 ont été traités par 5 mM de DHPNO₂ durant 2 heures à 37°C et un spectre RPE a été enregistré après congélation de l'échantillon à 10K.

Le spectre obtenu (résultat non montré) correspond au spectre de l'espèce [3Fe-4S] de la protéine IRP1 et il a été quantifié approximativement à 0.8 spin par molécule.

Ainsi, l'oxygène singulet, aisément généré par l'endoperoxyde DHPNO₂, inactive IRP1 sous sa forme aconitase en formant un centre [3Fe-4S] sur la protéine.

A B C

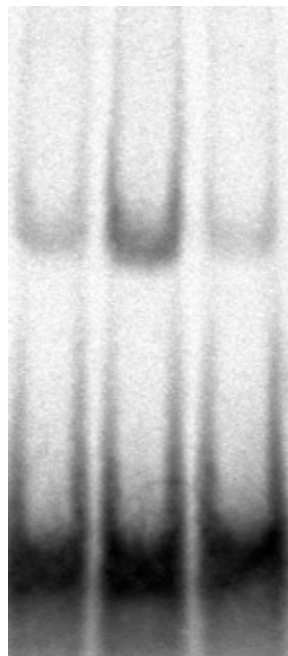


Figure III-19 : Dosage de l'activité de fixation au motif IRE de 20 μ M rhIRP1 incubée en présence de 10 mM DHPNO₂.

20 ng rhIRP1 avant incubation, en absence (A) et en présence (B) de 2% de 2ME
20 ng rhIRP1 après incubation en absence de 2% de 2ME (C).

III-A-4-b Discussion

La réactivité de l'oxygène singulet est qualitativement similaire à celle du peroxyde d'hydrogène. Elle conduit à une inactivation de l'aconitase, une absence de gain de l'activité de fixation au motif IRE et la génération d'un signal RPE correspondant à l'agrégat [3Fe-4S]. On peut donc conclure que l'oxygène singulet agit sur la protéine IRP1 sous sa forme [4Fe-4S], en libérant un atome de fer, mais en ne dégradant pas davantage l'agrégat fer-soufre.

Néanmoins l'oxygène singulet est beaucoup moins efficace que le peroxyde d'hydrogène. En effet, il est nécessaire d'utiliser un plus fort excès stœchiométrique de DHPNO₂ (10 mM) que de peroxyde d'hydrogène (100 µM) pour observer une cinétique d'inactivation semblable.

La perte d'activité aconitase observée (Figure III-18) est en accord qualitatif avec l'étude effectuée sur les kératinocytes humains (Giordani *et coll.* 1998), mais opposée aux résultats obtenus sur les fibroblastes primaires humains (Pourzand *et coll.* 1998).

Lors de notre étude, aucune inhibition irréversible de l'activité de fixation au motif IRE n'a pu être observée (Figure III-19), contrairement à ce qui a pu être rapporté en irradiant des cellules (Giordani *et coll.* 2000).

In vivo, l'oxygène singulet est un effecteur efficace de l'expression de certains gènes (hème oxygénase-1, protéines de type "*heat-shock*", etc...). Il peut aussi activer certaines cytokines (IL-1α, IL-1β,...) et les facteurs de transcription comme NF-κB. Il agit aussi au niveau des cascades de transduction par la régulation de kinases et de phosphatases (Ryters et Tyrell 1998). Nombre de ces cibles peuvent à leur tour agir sur l'activité des IRP. Ces multiples niveaux d'action peuvent ainsi expliquer les différences de réactivité observées entre les cellules et la protéine purifiée, mais aussi celles entre les divers types cellulaires utilisés (Pourzand *et coll.* 1998, Giordani *et coll.* 1998, 2000), dont la réponse à l'oxygène singulet peut différer.

III-B EFFET DE LA DOXORUBICINE

Des composés chimiques autres que les espèces réactives de l'oxygène, ont montré une capacité de modulation de l'activité des IRP. Ainsi l'ascorbate (Toth et Bridges 1995) ou l'oxalomalate (Festa *et coll.* 2000) favorisent la forme aconitase de la protéine, tandis que d'autres, tels que certaines cytokines (Piñero *et coll.* 2000) ou certaines hormones (Thomson *et coll.* 2000) peuvent au contraire favoriser la forme fixatrice du motif IRE.

Parmi ces composés, la doxorubicine, composé de la famille des anthracyclines (Figure III-20) largement utilisé en chimiothérapie pour le traitement d'un grand nombre de cancers grâce à ses propriétés cytostatiques, a dernièrement fait l'objet d'une attention particulière (Minotti *et coll.* 1999).

Même si les détails du mécanisme d'action de la doxorubicine restent partiellement inconnus et controversés, l'interaction de la drogue avec la double hélice d'ADN semble être une étape nécessaire à l'effet cytostatique de la drogue. Notamment, l'intercalation du noyau poly-aromatique aglycone interfère avec diverses protéines agissant sur l'ADN telles les topoisomérases de type II et les hélicases (Gewirth 1999). L'inhibition de la synthèse de l'ADN est associée à l'apparition de dommages, comme les coupures double-brin, ce qui confère à la drogue son caractère anti-proliférateur.

Des études structurales réalisées sur des oligonucléotides modèles ont démontré que l'autre partie de la molécule (daunosine) peut lier la fonction amine d'une guanine par l'intermédiaire d'un groupement méthylène, provenant d'une molécule de formaldéhyde (Zeman *et coll.* 1999, Figure III-21). On peut supposer qu'*in vivo* cette liaison covalente peut permettre de stabiliser l'intercalation de la drogue dans la double hélice, mais néanmoins, le formaldéhyde libre est difficile à détecter à cause de sa très grande réactivité avec les amines et surtout de son association avec le glutathion généralement présent en grand excès dans les cellules. *In vitro*, le formaldéhyde peut néanmoins être facilement produit, en présence d'oxygène, à partir de composés cellulaires tels que des amines ou des lipides, en catalyse avec des métaux de transition à l'état réduit et notamment le fer ferreux (Taatzjes *et coll.* 2001).

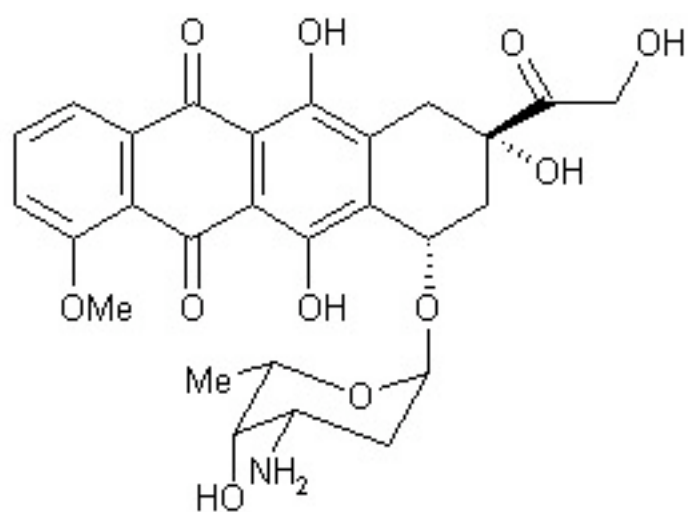


Figure III-20 : Doxorubicine.

Malgré ses propriétés anticancéreuses, l'usage de la doxorubicine conduit à différents effets secondaires, principalement ciblés au niveau des tissus cardiaques, qui se traduisent sous la forme d'arythmies et d'hypotension et, lors d'un traitement intensif, peuvent conduire à la mort (Singal *et coll.* 2000).

Les mécanismes de la toxicité causée par les anthracyclines semblent être multiples : (fragilisation des membranes, modification des voies de transduction du signal, dérégulation de l'homéostasie du calcium, etc...). Notamment, l'émergence d'une situation de stress oxydant et la génération de radicaux libres, dans lesquels la présence de fer semble être un facteur important (Kotamraju *et coll.* 2000), sont impliquées.

Le rôle du fer dans ces phénomènes de toxicité est corroboré par l'utilisation clinique de dexrazoxane (ICRF-187), un chélateur de fer, afin de lutter contre la cardiotoxicité de la doxorubicine et ses dérivés.

Ainsi le fer peut jouer un rôle au moins dual :

- Il semble nécessaire à la formation par catalyse avec l'oxygène de l'espèce mono-carbonée permettant la réticulation à la double hélice d'ADN pour conférer à l'anthracycline son activité anti-prolifératrice.
- Il peut aussi participer à la situation de stress oxydant menant aux phénomènes de cardiotoxicité.

Ceci nous a poussé à étudier l'évolution de la disponibilité en fer de différentes cellules traitées avec la doxorubicine en étudiant le principal système régulateur de l'homéostasie de ce métal, le système IRP/IRE.

Pour cela deux lignées cellulaires ont été utilisées : des lignées résistantes à la doxorubicine ont été dérivées pour chacune d'elles. Il s'agit des lignées K562 (Chénais *et coll.* 2000) issue d'une leucémie humaine et GLC4 (Andriollo *et coll.* 1999), d'un carcinome pulmonaire humain. Les différents extraits cellulaires utilisés dans cette étude ont été préparés selon le protocole décrit dans le chapitre matériels et méthodes (VIII-D-5).

III-B-1 Résultats

III-B-1-a Effet de la résistance à la doxorubicine

L'activité des IRP pour leur fixation au motif IRE dans 5 µg d'extraits cytosoliques des souches sensibles et résistantes de la lignée K562 a été mesurée (Figure III-22).

Seule une partie des IRP est active dans les extraits de cellules sensibles, comme en témoigne la bande moins intense en absence de 2ME (Figure III-22, puits A) qu'en présence de 2% de 2ME (Figure III-22, puits B). La partie inactive, de 30 à 60 %, selon les différents lots de cellules examinés, se trouve donc sous une forme (aconitase, [3Fe-4S], apo-protéine aux cystéines oxydées, etc...) activable *in vitro*. Au contraire, dans les cellules résistantes, les IRP sont totalement activées comme le montrent les bandes retardées d'une intensité semblable en absence ou en présence de 2ME (Figure III-22, puits C et D).

Des résultats similaires ont pu être obtenus avec les souches sensibles et résistantes de la lignée GLC4 (résultats non montrés).

En parallèle au dosage de l'activité des IRP, un dosage de la quantité de ferritine totale a été réalisé par le Dr J-C. Renversez (DBI, CHU Grenoble, France) sur les différents extraits cytosoliques des cellules sensibles et résistantes (Tableau III-1). Ce dosage effectué par une méthode immunoenzymatique ELISA-sandwich à l'aide d'anticorps anti-ferritine humaine, a permis de quantifier, pour la lignée leucémique (K562), la ferritine à 1 µg/mg de protéine totale dans les extraits cytosoliques de la souche sensible (K562^S), alors que dans les extraits cytosoliques de la souche résistante (K562^R) la ferritine n'a été quantifiée qu'à 0.5 µg/mg de protéine.

La plus faible quantité de ferritine mesurée dans les extraits de cellules résistantes par rapport aux extraits de cellules sensibles est en accord avec l'état d'activité maximale des IRP. En effet, lorsque la protéine est active pour sa fixation au motif IRE, elle inhibe la traduction

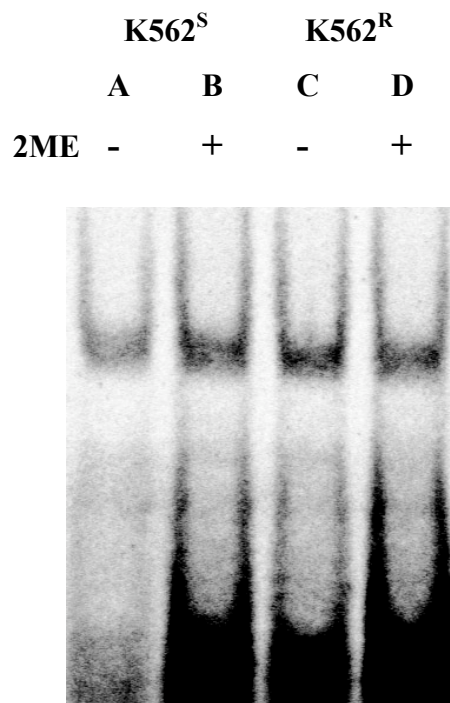


Figure III-22 : Dosage de l'activité de fixation au motif IRE de 5 µg d'extraits cytosoliques de différentes lignées cellulaires.

A : K562 sensible; B : K562 résistante

Extrait Cytosolique	Quantité totale de ferritine (µg/mg de protéine)
K562 ^S	1
K562 ^R	0.5
GLC4 ^S	0.5
GLC4 ^R	1

Tableau III-1 : Quantification de la ferritine totale dans différentes lignées cellulaires.

des messagers codant pour les différentes sous unités de la ferritine, ce qui explique la plus faible quantité de cette protéine dans les extraits de cellules résistantes où les IRP sont totalement activées.

Dans la lignée GLC4, la ferritine a pu être quantifiée à 0.5 µg/mg de protéine totale dans la souche sensible (GLC4^S) et 1 µg/mg dans la souche résistante (GLC4^R). Ainsi, à l'opposé de la lignée K562, les cellules sensibles GLC4 montrent une plus faible quantité de ferritine que dans la souche résistante correspondante.

Ce résultat contradictoire peut être lié au fait que les différentes lignées cellulaires ne présentent pas une résistance identique à la doxorubicine. En effet, les cellules GLC4 résistantes ont un seuil de résistance à la drogue beaucoup plus faible que les cellules résistantes de la lignée leucémique K562, respectivement 12.5 µM et au-delà de 100 µM (détermination imprécise) pour la moitié de la dose létale. Comme, la ferritine n'est pas uniquement régulée au niveau traductionnel (via les IRP), mais également au niveau transcriptionnel et notamment dans des conditions de stress oxydant dont la doxorubicine peut être à l'origine, une modulation de la transcription de la ferritine peut avoir lieu (Tsuji *et coll.* 2000, Balla *et coll.* 1992). Les quantités de ferritine mesurées correspondent donc à différents signaux de régulation qui peuvent expliquer les différences de concentration entre les deux lignées et c'est pourquoi nous nous sommes focalisés aux seuls effets de la doxorubicine sur l'activité des IRP.

III-B-1-b Effet *in vivo* de la doxorubicine sur l'état des IRP

Les cellules GLC4 sensibles ont été incubées en présence de différentes doses de doxorubicine, 0.5 et 1 µM, correspondant respectivement à 1/2 et 1 fois la dose létale, et les extraits cytosoliques ont été préparés puis dosés pour leur activité de fixation au motif IRE (Figure III-23).

Le puits C, correspondant au traitement par 0.5 µM de doxorubicine, présente une bande retardée d'une intensité moindre que la bande du puits A correspondant à l'extrait des cellules non traitées par la doxorubicine. La bande du puits E, correspondant au traitement des

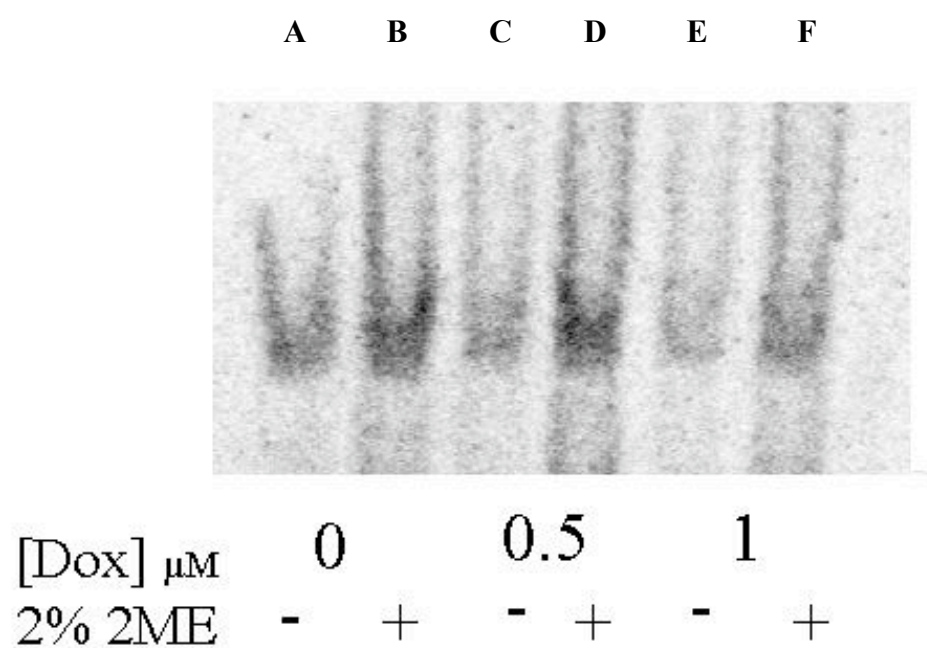


Figure III-23 : Dosage de l'activité de fixation au motif IRE
de 5 μ g d'extraits cytosoliques de cellules GLC4 sensibles préalablement traitées
avec différentes concentrations de doxorubicine.

cellules par 1 μ M de doxorubicine, présente une intensité encore plus faible. Par contre, l'intensité des bandes en présence de 2% de 2ME (Figure III-23, puits B,D et F) n'évolue pas, démontrant que la capacité totale de fixation du motif IRE par les IRP est inchangée.

Des cellules résistantes GLC4 ont été traitées dans les mêmes conditions (1/2 et 1 fois la dose létale de doxorubicine, respectivement 12.5 et 25 μ M). Dans ces conditions, l'intensité des bandes retardées, maximales, n'évolue pas non plus suite à l'incubation avec les différentes concentrations de l'anthracycline (résultats non montrés).

Ainsi, le traitement par différentes concentrations de doxorubicine modifie l'état d'activité des IRP des cellules sensibles. Au fur et à mesure que la dose d'anthracycline augmente, les IRP deviennent de moins en moins actives pour leur fixation au motif IRE, mais restent toujours activables par l'ajout de 2% de 2ME. A l'opposé, le traitement des cellules résistantes n'entraîne aucune modification de l'activité des IRP qui restent, comme précédemment observé pour les cellules non traitées, fortement actives vis à vis de la fixation au motif IRE.

III-B-1-c Effet de la doxorubicine sur les extraits cellulaires

Afin de déterminer si le phénomène observé est dû à un effet direct de la drogue sur la protéine, des expériences ont été réalisées en exposant directement des extraits cytosoliques à la doxorubicine.

Pour cela, 10 μ g d'extrait cytosolique de cellules GLC4 sensibles ont été incubés durant 60 min à 37°C avec 1 et 5 μ M de doxorubicine, puis dosés pour leur activité de fixation au motif IRE en présence et en absence de 2ME, à raison de 5 μ g d'extrait cellulaire par dosage (Figure III-24).

L'intensité de la bande retardée dans les puits C et E, correspondant aux extraits incubés en présence de doxorubicine et dosés en absence de 2ME, n'évolue pas ou très peu avec le traitement, par rapport à l'activité initiale (Figure III-24, Puits A). Au contraire, en présence de 2% de 2ME (Figure III-24, Puits D et F) on observe une diminution de l'intensité

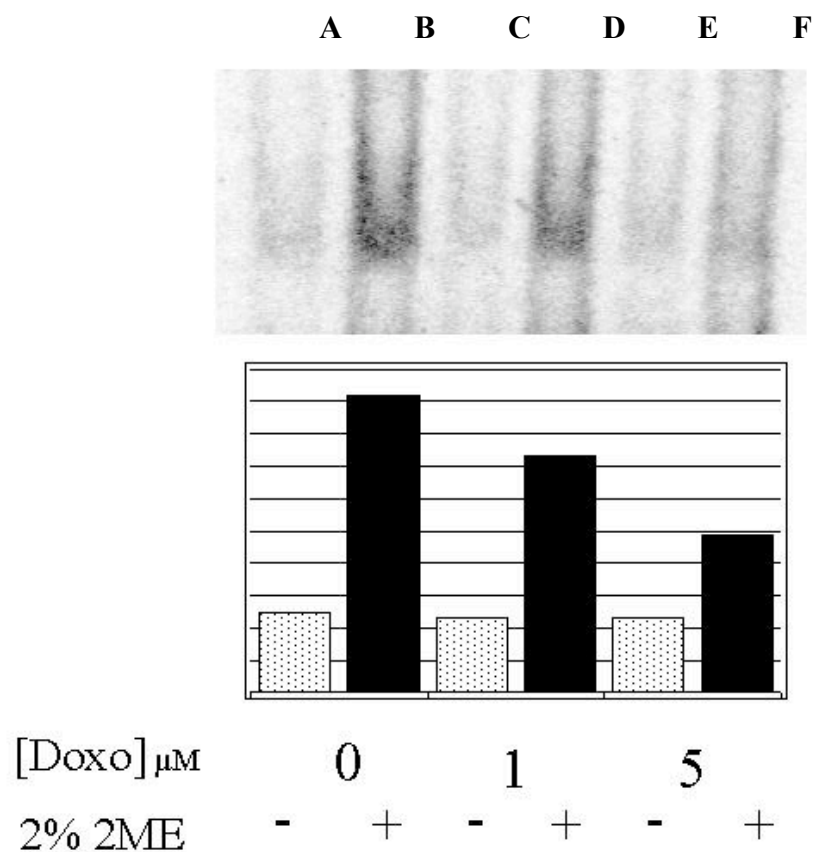


Figure III-24 : Dosage de l'activité de fixation au motif IRE de 5 μg d'extraits cytosoliques traités par différentes concentration de doxorubicine.

L'histogramme reprend les intensités des différentes bandes retardées.

des bandes selon la quantité de doxorubicine par rapport aux extraits non traités (Figure III-24, Puits B).

Ainsi la doxorubicine a un effet dans les extraits différent de celui observé sur les cellules, puisque la quantité totale de protéines capable de fixer le motif IRE, révélée par l'ajout de 2% de 2ME, diminue avec l'augmentation de la quantité d'anthracycline.

La doxorubicine est métabolisée en différents composés (Takanashi et Bachur 1976) qui peuvent participer aux effets de la drogue. Parmi les différents métabolites, le doxorubicinol (Figure III-25) correspondant à la réduction en alcool de la fonction cétone en C-13, en est le dérivé principalement excrété .

Les effets du doxorubicinol et de la doxorubicine ont donc été testés directement sur la protéine rhIRP1 et, pour cela, le doxorubicinol a dû être préparé.

III-B-1-d Synthèse du Doxorubicinol

Le doxorubicinol a été obtenu par réduction chimique de la doxorubicine à l'aide de borohydrure de potassium (Cf chapitre VIII-J-5)

Le produit de réduction, de couleur rouge, purifié par CLHP en phase inverse est élué en un pic unique avec un temps de rétention de 10 min (Figure III-26), alors que la doxorubicine utilisée dans la réaction est éluee en un pic unique à un temps de rétention de 15 min (Figure III-26).

Le produit de réduction, le doxorubicinol, est donc pur après l'étape d'extraction au chloroforme. La caractéristique de rétention sur phase inverse est en accord avec le remplacement d'une cétone par une fonction alcool plus hydrophile, ce qui explique un temps de rétention plus court (de Bruijn *et coll.* 1999).

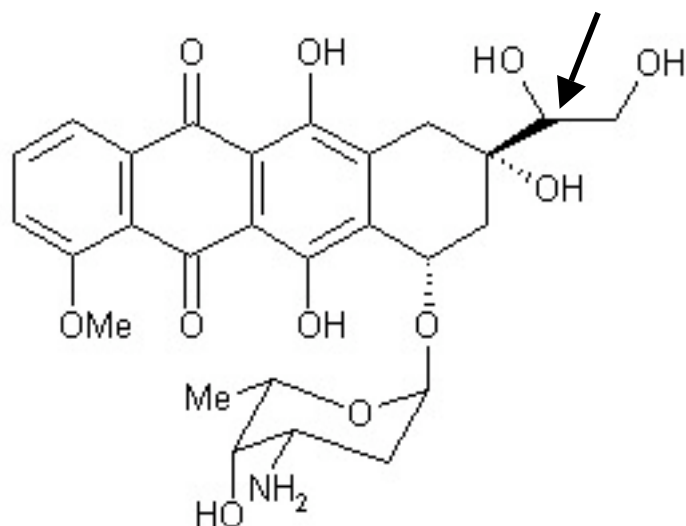


Figure III-25 : Doxorubicinol.

La flèche indique la fonction réduite par rapport à la doxorubicine.

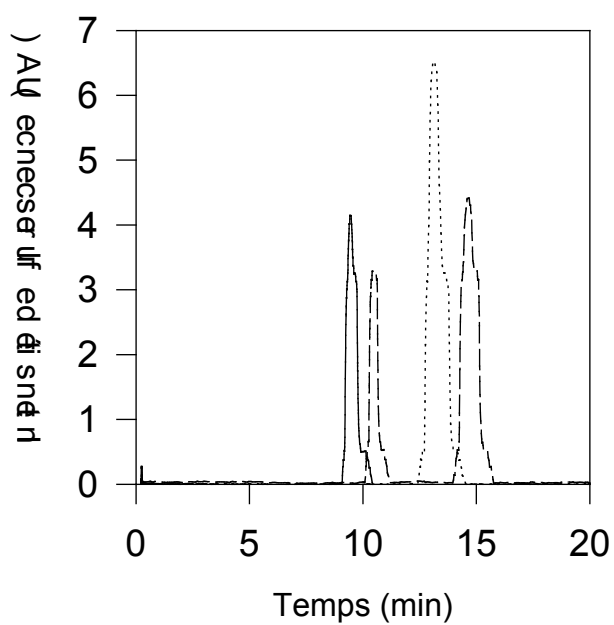


Figure III-26 : Purification du doxorubicinol par chromatographie de phase inverse sur résine C18.

Trait plein : produit de réduction de la doxorubicine; Pointillés : doxorubicine.
Tirets : mélange [1:1] doxorubicine : produit de réduction de la doxorubicine.

III-B-1-e Effet de la doxorubicine et du doxorubicinol sur la protéine recombinante IRP1

III-B-1-e-i Effet sur l'activité aconitase de rhIRP1

10 μ M de rhIRP1, sous forme aconitase, dans un tampon 20 mM Tris-Cl pH 7.4 ont été incubés durant deux heures en présence de 120 μ M de doxorubicine en absence d'oxygène dans une boîte à gants. L'évolution de l'activité aconitase a été mesurée en prélevant et en dosant différents aliquotes à intervalles réguliers (Figure III-27). L'activité aconitase reste maximale tout du long de l'incubation. Une expérience identique a été effectuée en présence de doxorubicinol (Figure III-27). De même, aucune évolution de l'activité n'est visible.

Ces incubations avec la doxorubicine ou le doxorubicinol ont alors été renouvelées dans les mêmes conditions mais en présence d'oxygène en maintenant le microtube contenant le milieu d'incubation ouvert à l'air (Figure III-27).

Dans le cas de la doxorubicine, l'activité décroît lentement au cours de l'incubation, pour atteindre près des 3/4 de l'activité initiale après deux heures. Pour le doxorubicinol, l'activité aconitase diminue rapidement et elle ne représente plus que 1/3 de l'activité initiale après les deux heures d'incubation.

Ceci démontre que l'oxygène joue un rôle prépondérant dans l'inhibition de l'activité aconitase de la protéine rhIRP1 par la doxorubicine ou le doxorubicinol.

III-B-1-e-ii Effet sur l'activité de fixation au motif IRE de rhIRP1

L'activité de fixation au motif IRE a été mesurée afin de déterminer si la perte d'activité aconitase observée est liée à une apparition de l'activité de fixation au motif IRE. Pour cela, des aliquotes de la solution d'incubation en présence de doxorubicinol ont été prélevés avant et après la réaction et ont été dosés pour cette activité, en présence ou en absence de 2% de 2ME (Figure III-28).

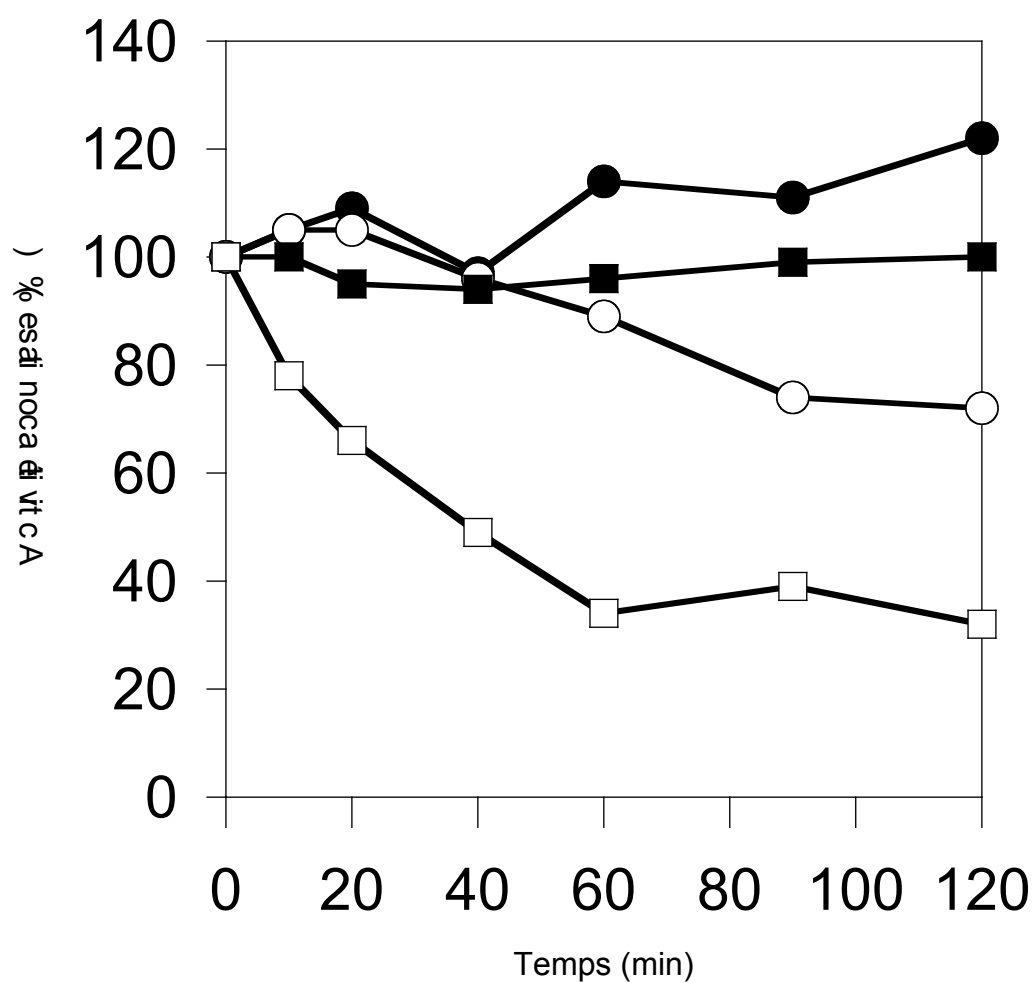


Figure III-27 : Evolution de l'activité aconitase d'aliquotes de 10 μ M de rhIRP1 lors de l'incubation avec 120 μ M de doxorubicine (ronds) et 120 μ M de doxorubicinol (carrés) en absence (noir) ou en présence (blanc) d'oxygène.

	A	B	C	D
2ME	-	+	-	+
Temps (min)	0		120	

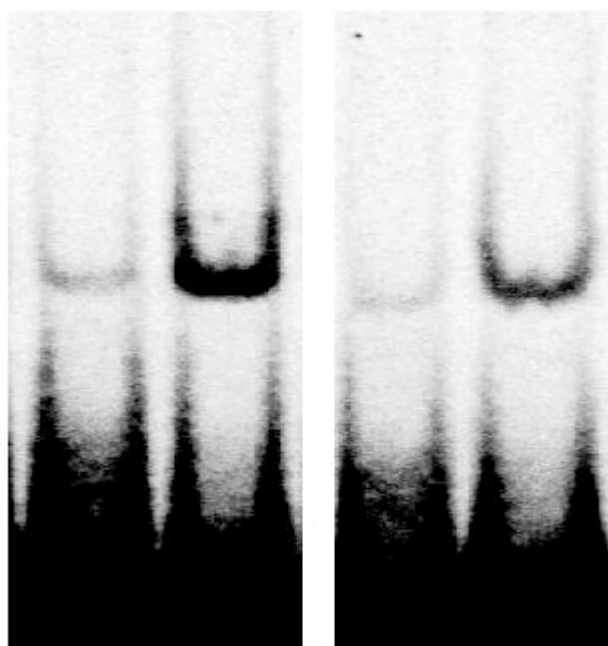


Figure III-28 : Dosage de l'activité de fixation au motif IRE de 30 ng de rhIRP1 avant (A&B) et après (C&D) incubation avec le doxorubicinol.

La protéine avant incubation présente une faible bande retardée (Figure III-28, puits A) qui est amplifiée par l'ajout de 2% de 2ME lors du dosage (Figure III-28, puits B). Après les deux heures d'incubation avec le doxorubicinol, la protéine présente toujours une faible bande retardée en absence de 2ME (Figure III-28, puits C) démontrant que l'activité de fixation au motif IRE n'est pas activée par cette anthracycline. L'ajout de 2% de 2ME lors du dosage permet de révéler une bande de plus forte intensité (Figure III-28, puits D), mais néanmoins moins intense que celle observée avant incubation (Figure III-28, puits B).

Ainsi, comme il a été observé lors de l'incubation des extraits cytosoliques avec la doxorubicine, l'incubation de la protéine rhIRP1 en présence de doxorubicinol ne permet pas de révéler l'activité de fixation au motif IRE. Cette observation diffère de celle faite lors des traitements des cellules sensibles. De plus, comme observé avec l'incubation des extraits cellulaires, une inactivation irréversible de la protéine se produit, puisque la quantité totale capable de fixer le motif IRE, visible par l'ajout de 2% de 2ME, diminue.

III-B-1-e-iii Etudes spectroscopiques UV-visible et RPE

Afin d'étudier plus avant ce mécanisme, l'étude de l'action de la doxorubicine sur la protéine rhIRP1 a été faite par spectrophotométrie en mesurant la chélation de fer par la drogue, grâce à l'apparition d'une bande d'absorption à 600 nm correspondant au complexe doxorubicine:Fe supposé [3:1] en prenant un coefficient d'absorption de $11400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Myers *et coll.* 1982).

10 μM de rhIRP1 ont été incubés, en présence d'oxygène (à l'air), avec 120 μM de doxorubicine durant 7 heures à température ambiante. L'absorption à 600 nm a été mesurée à intervalles réguliers (Figure III-29) et approximativement 7 μM de complexe doxorubicine:Fe ont pu être quantifiés.

Par analogie avec l'effet du peroxyde d'hydrogène (Cf chapitre III-I-3), le fer chélaté peut provenir du centre fer-soufre de la protéine majoritairement sous sa forme aconitase [4Fe-4S] avant réaction.

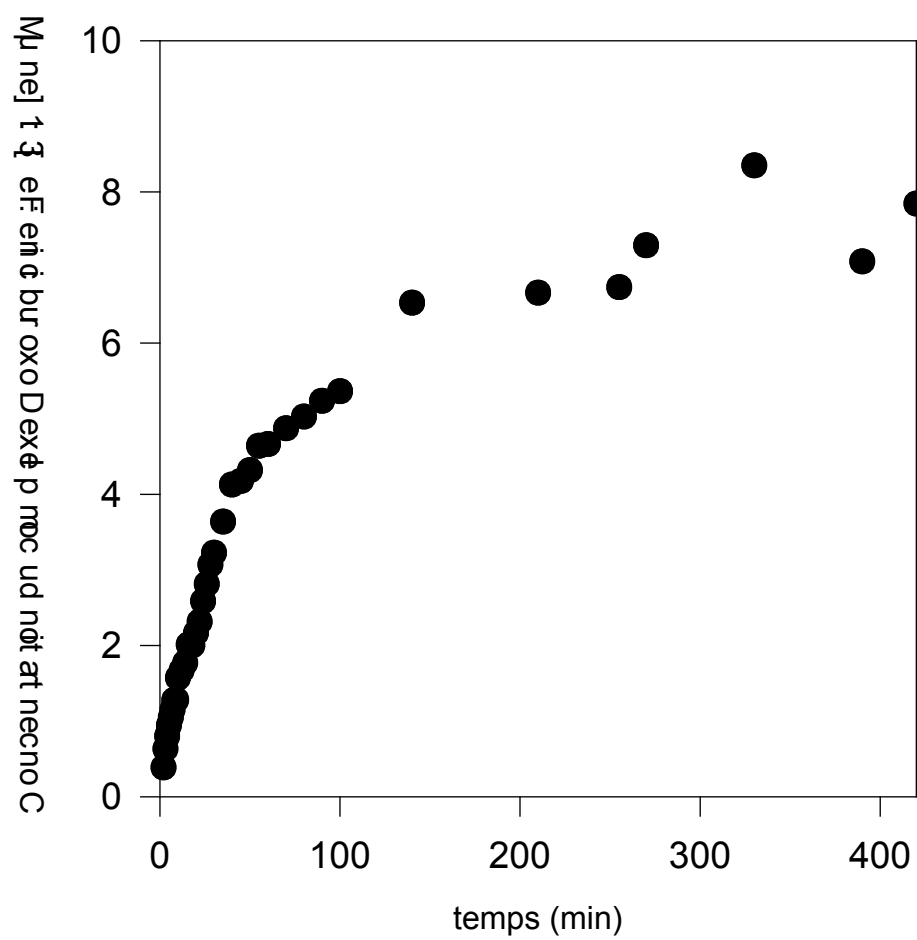


Figure III-29 : Quantification du complexe Doxorubicine:Fer [3:1] lors de l'incubation de 10 μM de rhIRP1 avec 120 μM de doxorubicine à l'oxygène.

L'évolution de l'agrégat a donc été étudiée en mesurant le spectre RPE à 10K de la solution après les 7 heures d'incubation (résultat non montré). Celui-ci est caractéristique de la forme [3Fe-4S] de la protéine IRP1 comme précédemment observé pour l'effet du peroxyde d'hydrogène (Cf chapitre III-A-3) et le signal RPE a pu être quantifié à 0.5 spin/molécule, ce qui correspond à 5 μ M de forme [3Fe-4S].

On peut estimer que la concentration de complexe doxorubicine:Fe est égale à la concentration d'espèce [3Fe-4S] de la protéine IRP1. Ces concentrations identiques démontrent que le fer chélaté par l'anthracycline provient de la perte d'un atome de fer de l'agrégat [4Fe-4S].

Ceci explique la perte d'activité aconitase qui a été observée à la fois avec la doxorubicine, et certainement aussi avec le doxorubicinol, en présence d'oxygène (Figure III-27). La génération de la forme [3Fe-4S] explique pourquoi aucune activation de la fixation au motif IRE n'est observée. Néanmoins, ces observations n'expliquent pas l'inhibition de l'activité totale de fixation qui est observée à la fois *in vitro*, soit avec les extraits cytosoliques de cellules sensibles (Figure III-24), soit avec la protéine recombinante IRP1 (Figure III-28).

III-B-2 Discussion

Les cellules sensibles et résistantes à la doxorubicine présentent un état d'activité différent des IRP pour la fixation au motif IRE. Dans les cellules sensibles, seule une partie des IRP présentes est active, alors que dans les cellules résistantes les IRP sont totalement activées. Cette différence d'activité ne peut être due à une carence en fer extracellulaire des cellules résistantes, puisque les différentes lignées sont cultivées dans un milieu identique, mais plus certainement par une gestion différente du fer intracellulaire dans ces différentes lignées.

Les cellules résistantes ne voient pas l'activité de leur IRP modifiée quand elles sont incubées avec la drogue, démontrant que cette dernière, malgré ses propriétés de chélation du fer, ne modifie pas l'activité basale des IRP de ces cellules.

Au contraire, les cellules sensibles, voient l'activité de leur IRP modifiée par l'incubation avec la doxorubicine et qui se traduit pas une inactivation de la fonction de fixation au motif IRE. De même, les propriétés de chélation du fer par la drogue ne peuvent expliquer la modification de l'activité des IRP. En effet une diminution de la disponibilité du métal se traduit par une augmentation de l'activité des IRP. Ici, au contraire, l'action de la doxorubicine semble se traduire par un accroissement de la quantité de fer intracellulaire aisément mobilisable.

La possible implication du complexe covalent entre la drogue et l'ADN, ponté par une molécule de formaldéhyde, dans l'action anti-prolifératrice de la doxorubicine, peut apporter une explication au phénomène de résistance. En effet le fer est potentiellement utile à la propagation de la situation de stress engendrée par l'anthracycline, comme catalyseur de la réduction de l'oxygène. Si ce fer est un facteur limitant pour la formation de l'espèce mono-carbonée, comme le montre la très forte activité basale des IRP dans les cellules résistantes, la faible production de formaldéhyde entraîne une moindre efficacité de l'activité anti-prolifératrice et confère donc aux cellules leur résistance.

L'activité totale des IRP, obtenue par l'ajout de 2% de 2ME dans le milieu de réaction, est sensiblement la même dans les cellules sensibles et résistantes (Figure III-22), et peut être retrouvée, après inactivation lors de l'incubation des cellules avec la doxorubicine (Figure III-23). *In vitro*, une telle inactivation réversible des IRP n'a pu être observée lors de l'incubation des extraits des cellules sensibles. Au contraire, ces conditions provoquent une inactivation partielle et irréversible par le traitement classique d'ajout de 2% de 2ME, de l'activité totale de fixation des IRP et peu ou pas de modification de l'activité basale. De même, en présence d'oxygène, l'incubation de la doxorubicine avec la protéine pure [4Fe-4S]-IRP1 conduit à la perte de l'activité aconitase, à la génération de l'espèce [3Fe-4S] et ne permet pas de révéler l'activité de fixation au motif IRE. Par contre, une inactivation partielle et irréversible de l'activité totale de fixation est observée. Cette inhibition partielle et irréversible peut s'expliquer par une modification irréversible d'un ou plusieurs résidus de la protéine et la génération d'une forme inactive pour la fixation du motif IRE, y compris en présence de 2ME. En effet, la doxorubicine peut générer des espèces dérivées de l'oxygène ou des formes radicalaires de la doxorubicine (quinone/semi-quinone) en présence d'oxygène (Singal *et coll.* 2000), qui sont alors susceptibles de modifier irréversiblement les IRP.

Des résultats qualitativement similaires, sur des extraits cellulaires de myocardiens humains où le doxorubicinol est généré à partir de doxorubicine et de NADPH, via des aldo-céto-réductases, et où l'activité totale des IRP est irréversiblement inactivée, ont récemment été rapportés (Minotti *et coll.* 1998). Ces expériences mettent en avant le rôle cardiotoxique de la drogue par des mécanismes impliquant le fer, via l'action du doxorubicinol et la dérégulation du système IRP/IRE.

Finalement, la différence de réactivité des IRP vis à vis de la doxorubicine des cellules entières et des extraits cellulaires (ou de la protéine purifiée) suggère deux niveaux d'action de la drogue : une action directe sur la protéine IRP et une action qui peut être médiée par différents effecteurs secondaires. De tels phénomènes ne sont pas sans précédent dans la réactivité des IRP. Par exemple, l'activation de IRP1 par de faibles quantités de peroxyde d'hydrogène semble être plutôt induite par une cascade de transduction du signal (Pantopoulos *et coll.* 1997) plus qu'à un effet direct de l'eau oxygénée (III-A-3).

III-C REACTIVITE DE IRP1 VIS A VIS DE THIOLS

L'exposition de cultures cellulaires à la desferrioxamine, un sidérophore puissant chélateur de fer, provoque un état de carence et permet d'obtenir des extraits cellulaires présentant une activité maximale des IRP endogènes pour leur fixation au motif IRE (Casey *et coll.* 1989).

A l'opposé, le traitement de cellules par de l'hémine, qui peut servir de source de fer, inactive totalement l'activité de fixation au motif IRE des IRP (Casey *et coll.* 1989).

Néanmoins, il a été démontré que le traitement d'extraits cytosoliques inactifs par surcharge en fer avec une concentration optimale de 2% [~ 0.3 M] de 2ME permet la révélation d'une bande correspondant au complexe IRE-IRP1 d'une intensité équivalente à celle observée lors du traitement avec la desferrioxamine (Hentze *et coll.* 1989).

Depuis, ce composé est utilisé en routine dans le dosage de l'activité de fixation d'IRP au motif IRE pour facilement révéler *in vitro* l'activité IRP totale présente.

Généralement, le 2ME est utilisé pour réduire les ponts disulfures présents dans une protéine. C'est pourquoi un premier modèle du mécanisme de régulation des IRP a initialement été proposé avec l'implication d'un équilibre en une forme contenant un tel pont et une forme réduite (Haile *et coll.* 1989). Mais, après la mise en évidence de l'insertion d'un centre fer-soufre au sein de la protéine (Constable *et coll.* 1992, Haile *et coll.* 1992a,b, Emery-Goodman *et coll.* 1993) et la nécessité de perdre la totalité du métal pour fixer le motif IRE, le rôle du 2ME dans le déplacement du centre fer-soufre a été supposé, sans preuve et sans en connaître le mécanisme.

Afin d'élucider ce mécanisme, l'effet du 2ME sur la forme métallée [4Fe-4S] de la protéine IRP1 a été étudié, ainsi que celui de divers autres thiols dont certains ont une fonction biologique.

III-C-1 Résultats

Les études ont toutes été réalisées en absence d'oxygène afin d'éviter la génération d'espèces réactives de l'oxygène par des traces de métaux de transition réduits par les thiols utilisés.

III-C-1-a Effet du 2ME

20 μ M de rhIRP1 dans 5 mM HEPES-OH pH 7.4, avec 20 μ M de citrate, ont été traités avec différentes concentrations de 2ME (25 à 400 mM) et l'évolution de l'activité aconitase (mesurée par l'ajout de 200 μ M de *cis*-aconitase) a été suivie en prélevant et en dosant différents aliquotes à intervalles réguliers (Figure III-30).

L'activité aconitase reste maximale durant toute la période d'incubation et cela quelle que soit la concentration de 2ME utilisée.

Cette observation inédite est à comparer avec le dosage de l'activité de fixation au motif IRE où l'utilisation de 2% de 2ME (~ 300 mM) permet de révéler la totalité de l'activité, donc d'inactiver l'aconitase par perte du centre [4Fe-4S] (Hentze *et coll.* 1989, résultats non montrés).

III-C-1-b Effet d'autres thiols

Le 2ME n'est pas un thiol physiologique, aussi d'autres espèces ont été utilisées afin de juger de leur capacité à modifier l'activité aconitase de la protéine IRP1.

Pour cela, 20 μ M de protéine rhIRP1 dans 50 mM de Tris-Cl pH 7.4 ou 5 mM HEPES-OH pH 7.0 ont été incubés avec 10, 50 et 100 mM de L-cystéine et 10 et 20 mM de glutathion (Figure III-31).

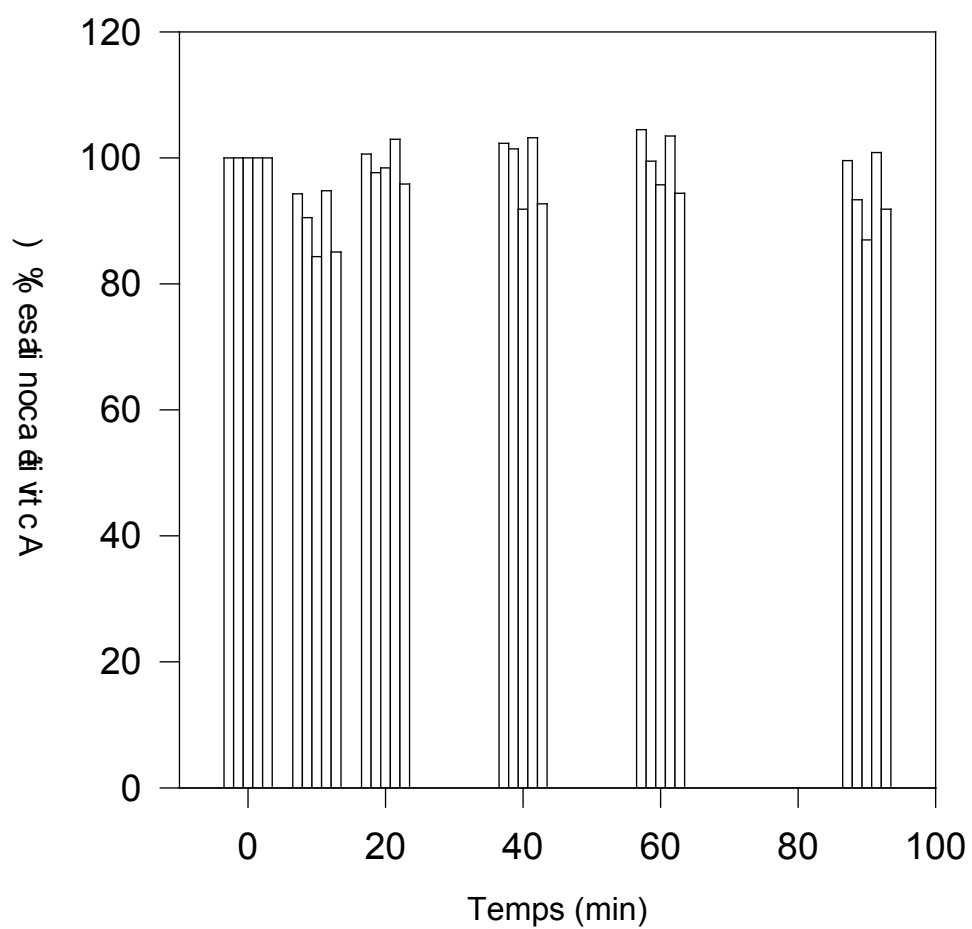


Figure III-30 : Evolution de l'activité aconitase de 20 μ M de rhIRP1 incubée avec différentes concentrations de 2ME.

De gauche à droite : 25, 50, 100, 300, 400 mM

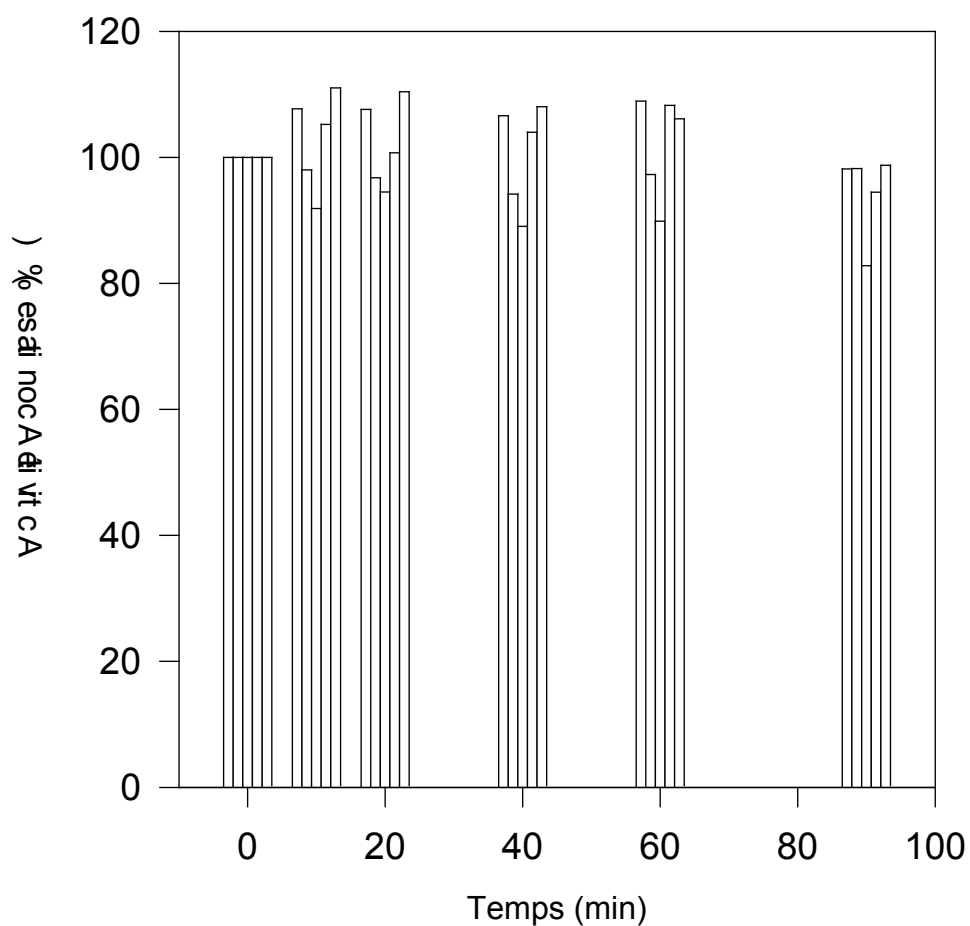


Figure III-31 : Evolution de l'activité aconitase de 20 μ M de rhIRP1 incubés avec différentes concentrations de différents thiols.

De gauche à droite : 10, 50, 100 mM L-Cys et 10 et 20 mM Glutathion.

Comme observé précédemment, aucune évolution de l'activité aconitase n'apparaît au cours des 90 minutes d'incubation, démontrant que le centre fer soufre de la protéine reste stable et capable de fixer et convertir son substrat en présence de ces différents thiols.

III-C-1-c Rôle protecteur du substrat

La présence de citrate à une stoechiométrie de 1:1 dans le milieu d'incubation contribue, par analogie avec la situation rencontrée avec l'aconitase mitochondriale (Lauble *et coll.* 1992), à protéger le centre [4Fe-4S], en particulier son fer non lié à la chaîne polypeptidique.

Le substrat présent dans la solution d'incubation peut donc jouer un rôle protecteur vis à vis de la dégradation du centre fer-soufre de la protéine par le 2ME. Une telle hypothèse a donc été examinée et pour cela, une solution de protéine rhIRP1 en présence de citrate a été filtrée sur gel en tampon 20 mM Tris-Cl pH 7.4 afin d'éliminer le substrat.

5 μ M de protéine rhIRP1 ont été incubés en présence de 250 mM (1.8%) de 2ME à température ambiante en absence d'oxygène durant 3 heures. L'évolution de l'activité aconitase a été mesurée en dosant périodiquement cette activité sur un aliquote de la solution d'incubation (Figure III-32).

Malgré une légère perte de l'activité aconitase dès l'ajout de 2ME, son évolution est ensuite annulée durant toute la durée de l'expérience, approximativement à ~70 % de l'activité initiale. La protéine ne présente plus une résistance aussi importante que précédemment observé, mais elle n'est pas totalement démétaillée malgré l'absence de substrat. Ainsi, le phénomène de protection offert par le citrate ne semble pas être la cause majeure de l'absence de destruction de l'agrégat fer-soufre par le 2ME observé en figure III-30 et le mécanisme d'action du 2ME observé lors du dosage de l'activité de fixation à l'ARN, reste toujours inexpliqué.

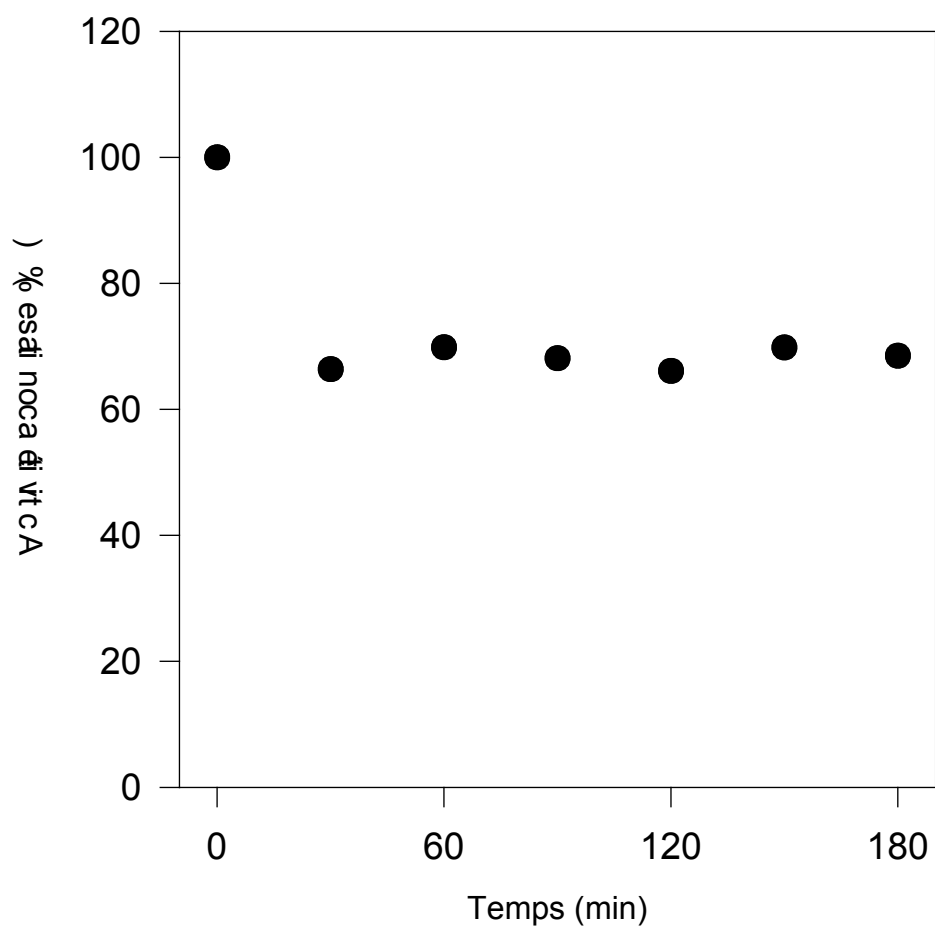


Figure III-32 : Evolution de l'activité aconitase de 5 μ M de rhIRP1 sans citrate en présence de 250 mM de 2ME.

III-C-1-d Rôle de l'IRE

La sonde d'ARN en excès dans les dosages d'activité de fixation et substrat de la forme démétallée peut jouer un rôle dans la formation de cette dernière en déplaçant l'équilibre entre la forme fixant l'ARN et les autres formes ne le fixant pas et, notamment, la forme aconitase.

Cette hypothèse a été étudiée en incubant 5 μ M de rhIRP1 sans citrate avec 5 μ M d'IRE dans 20 mM Tris-Cl pH 7.4 à température ambiante à l'abri de l'oxygène et en suivant l'évolution de l'activité aconitase. Après 15 minutes d'incubation, 250 mM de 2ME ont été ajoutés et, de nouveau, l'évolution de l'activité aconitase a été mesurée (Figure III-33).

Avant l'ajout du 2ME, l'activité aconitase reste maximale, malgré la présence de l'IRE à une stœchiométrie de [1:1] et le fait que la protéine ne présente plus de substrat au niveau de son centre fer-soufre, démontrant que l'IRE seule n'a pas d'action dans la modification de l'agrégat de la protéine IRP1. Dès l'ajout de 2ME, l'activité aconitase diminue pour atteindre 70% de l'activité initiale et reste stable comme précédemment observé en absence d'IRE (Figure III-32).

Il semble donc que la sonde d'ARN, ne stimule pas la perte d'activité aconitase et ne participe pas à l'apparition de la forme fixatrice du motif IRE en présence de 2ME.

III-C-1-e Rôle de la quantité de protéine

Les études biochimiques de suivi de l'évolution de l'activité aconitase nécessitent de grandes quantités de protéine par rapport aux quantités utilisées lors des dosages de l'activité de fixation au motif IRE, respectivement de l'ordre de quelques dizaines de microgrammes par rapport à une dizaine de nanogrammes. Cette différence de quantité de protéine pourrait expliquer l'absence de réactivité du 2ME vis à vis de l'activité aconitase.

Cette hypothèse a été examinée en réalisant une pré-incubation de faibles quantités de protéine sans substrat en présence d'un excès de 2ME puis en dosant l'activité de fixation au motif IRE de la solution.

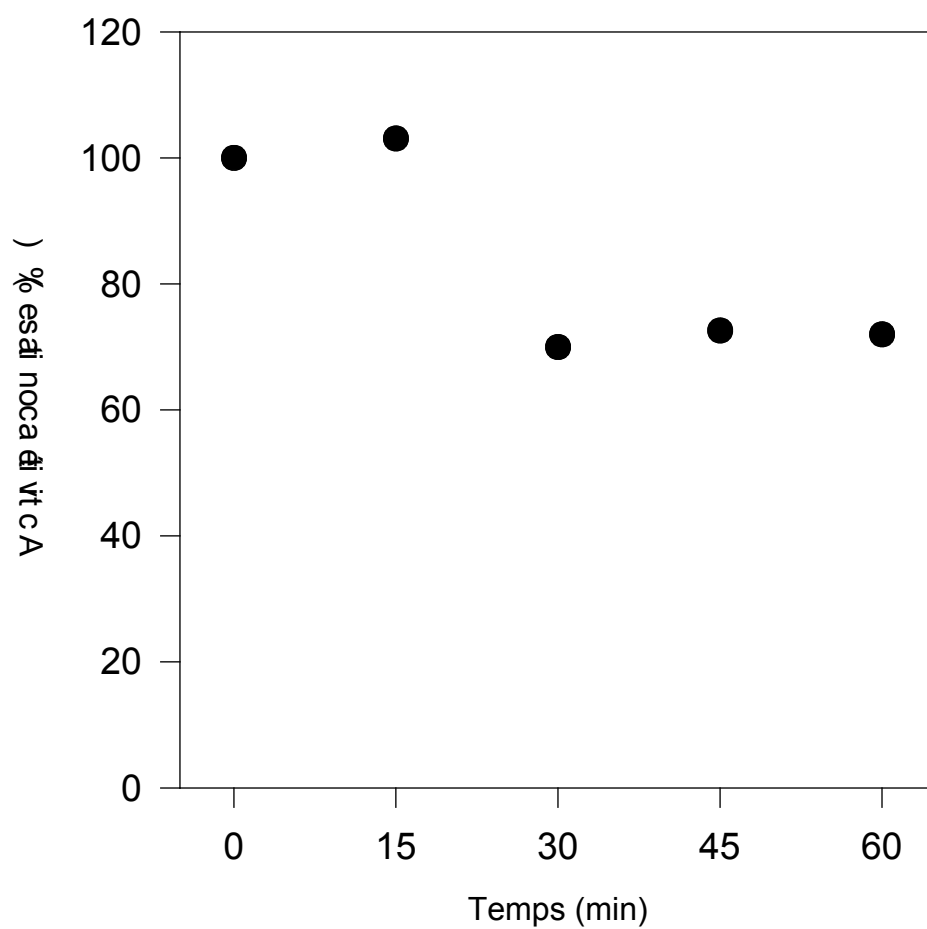


Figure III-33 : Evolution de l'activité aconitase de 5 μ M de rhIRP1 sans citrate en présence de 5 μ M d'IRE en présence de 250 mM de 2ME.

30 ng de rhIRP1 sans substrat, dans 20 mM Tris-Cl pH 7.4, ont été incubés avec 2.5% de 2ME toujours en absence d'oxygène durant 30 minutes et la solution a été utilisée pour doser l'activité de fixation au motif IRE en présence ou en absence de 2% de 2ME supplémentaires (Figure III-34).

[4Fe-4S]-rhIRP1 ne présente aucune bande retardée (Figure III-34, puits A), comme attendu pour la forme aconitase. Cette préparation est convertie en forme fixant l'ARN par l'ajout de 2% de 2ME lors du dosage de l'activité de fixation (Figure III-34, puits B).

Quand rhIRP1 est pré-incubée en présence de 2.5% de 2ME, 0.5% lors du dosage de fixation au motif IRE, seule une bande retardée (Figure III-34, puits C) de très faible intensité est révélée. En parallèle, quand ce même échantillon est porté à 2.5% de 2ME lors du dosage, une bande retardée (Figure III-34, puits D) aussi intense que celle correspondant à la totalité d'IRP1 active apparaît.

Malgré une activation partielle d'IRP1 (~ 15 %), la pré-incubation avec 2.5% de 2ME de faibles quantités de protéine rhIRP1 ne permet pas de révéler la totalité de l'activité. Seul un nouvel ajout de 2ME (2% de 2ME supplémentaires) lors de l'interaction avec l'IRE permet une telle activation.

III-C-1-f Rôle du caractère réducteur du 2ME

L'hypothèse du rôle réducteur de la molécule de 2ME pour la révélation de l'activité a été étudiée. Pour cela une expérience similaire à celle décrite précédemment a été réalisée, mais au lieu d'activer la solution pré-incubée avec un ajout de 2% de 2ME, un puissant réducteur, le dithionite, a été utilisé.

30 ng de rhIRP1 sans substrat, dans 20 mM Tris-Cl pH 7.4, ont été incubés avec 2.5% de 2ME en absence d'oxygène durant 30 minutes et la solution utilisée pour doser l'activité de fixation au motif IRE en présence ou en absence de 10 mM de Na₂S₂O₄ (Figure III-35).

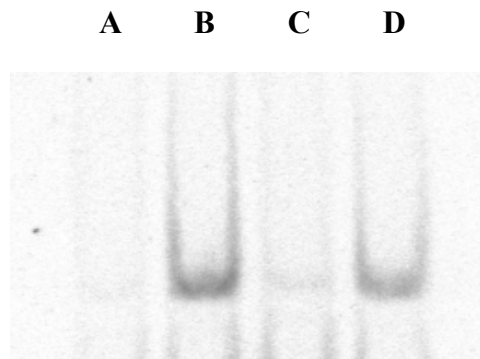


Figure III-34 : Dosage de l'activité de fixation au motif IRE de 30 ng de rhIRP1 préincubée (C&D) ou non (A&B) avec 2.5% 2ME, avec (B&D) ou sans (A&C) 2% de 2ME.

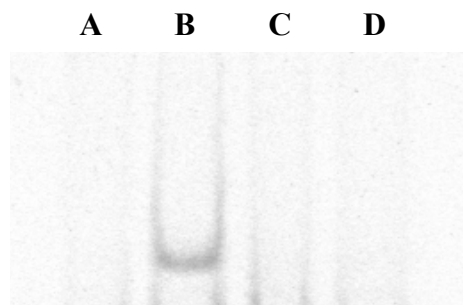


Figure III-35 : Dosage de l'activité de fixation au motif IRE de 30 ng de rhIRP1 préincubée (C&D) ou non (A&B) avec 2.5% de 2ME, avec (B), sans (A&C) 2% 2ME ou avec (D) 10 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$.

Conformément à l'expérience précédente, la protéine [4Fe-4S]-rhIRP1 n'est pas active pour la fixation du motif IRE (Figure III-35, puits A), mais peut être activée par l'ajout de 2% de 2ME lors du dosage de l'activité de fixation au motif IRE (Figure III-35, puits B). La pré-incubation de la protéine avec 2.5% de 2ME ne permet pas de révéler l'activité de fixation au motif IRE (Figure III-35, puits C) comme précédemment observé (Figure III-34, puits C). L'ajout, après la pré-incubation avec 2.5% de 2ME, de 10 mM de dithionite ne permet pas de révéler l'activité de fixation comme le montre l'absence de complexe ARN/Protéine (Figure III-35, puits D).

Ainsi un réducteur aussi puissant que le dithionite ne semble pas capable d'activer les IRP, ce qui exclut que le pouvoir réducteur du 2ME soit à l'origine de son effet activateur pour la fixation aux IRE aux fortes concentrations.

III-C-1-g Effet solvant du 2ME

Le 2ME, de formule chimique C_2H_6OS , présente une fonction alcool supplémentaire à la fonction thiol, associée à son activité de réduction des ponts disulfures. Afin de vérifier si les fortes concentrations de 2ME utilisées pourraient avoir un effet non spécifique à la fonction thiol, la protéine rhIRP1 sous sa forme aconitase a été incubée en présence de 1.7% d'éthanol (EtOH), équivalente à 2% 2ME en rapport molaire, afin de vérifier si cette quantité d'alcool peut servir à activer la protéine vis à vis de la fixation de l'ARN.

15 ng de protéine ont été dosés pour leur activité de fixation au motif IRE, en absence de 2ME, en présence de 2% de 2ME et en présence de 1.7% de EtOH. (Figure III-36).

Comme attendu, en absence de 2ME l'intensité de la bande associée au complexe ARN/protéine est relativement faible (Figure III-36, puits A). Elle devient plus intense avec l'ajout de 2% de 2ME lors du dosage de l'activité de fixation (Figure III-36, puits B). L'ajout de 1.7% d'éthanol dans le milieu de réaction lors du dosage de l'activité, permet de révéler une bande d'une forte intensité (Figure III-36, puits D) aussi intense que celle observée avec l'ajout de 2% de 2ME (Figure III-36, puits B).

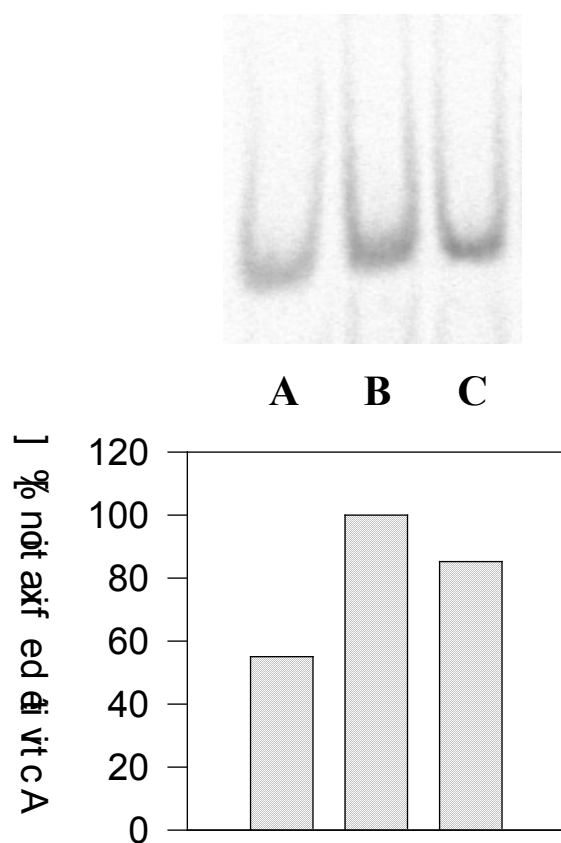


Figure III-36 : Dosage de l'activité de fixation au motif IRE de 30 ng de rhIRP1 en absence (A), en présence (B) de 2% 2ME ou en présence (C) de 1.7% EtOH.

L'histogramme reprend les intensités des différentes bandes retardées.

Une explication alternative de la réactivité du 2ME et de l'éthanol, serait la possibilité d'une variation de pH induite pas l'ajout de fortes quantités de ces solvants. En effet, les protéines à centre fer-soufre sont sensibles à la modification du pH et, notamment, les pH acides ont été utilisés pour former certaines apo-protéines (Hong et Rabinowitz 1967). Il a aussi été démontré que sous l'action d'un réducteur et d'un pH élevé, la protéine IRP1 pouvait être activée totalement pour son activité de fixation aux IRE (Haile *et coll.* 1992a).

La différence de pH a été mesuré entre la solution de réaction de fixation au motif IRE et cette même solution en présence de 2% de 2ME. Le pH initial mesuré à 7.6, ne subit qu'une très faible chute à pH 7.4. Cette différence de pH ne semble pas à même d'expliquer la perte du cluster de la protéine.

III-C-2 Discussion

L'effet activateur du 2ME sur les IRP pour leur fixation au motif IRE, ne peut être dû à son caractère réducteur. En effet, les différents réducteurs physiologiques ou chimiques utilisés n'ont pas permis d'inactiver la forme aconitase de IRP1 et d'autant moins d'activer rhIRP1 pour la fixation à l'IRE. Notamment le dithionite, qui présente un potentiel de réduction plus bas que celui du glutathion ou de la L-Cystéine, n'a pas permis une activation de la protéine (Figure III-35). Une telle absence d'activation en présence d'une grande quantité de réducteur (100 mM DTT) a aussi été rapportée (Haile *et coll.* 1992a).

Néanmoins, le fait que le 2ME joue un rôle dans la réduction de ponts disulfures formés entre différentes cystéines ligands de l'agrégat fer-soufre dans la forme apo-protéine oxydée de IRP1 n'est pas remis en cause. C'est sûrement la raison du léger effet d'activation observé lors de la préincubation avec 2.5% de 2ME (Figure III-34, puit C). Pourtant cet effet doit se produire à des concentrations beaucoup plus faibles que 2% (Bouton *et coll.* 1997, Haile *et coll.* 1992a).

L'effet protecteur de l'agrégat [4Fe-4S] apporté par le substrat ne permet pas d'expliquer en totalité l'absence d'inactivation de l'aconitase. Un effet coopératif de l'IRE dans l'action du 2ME n'est pas déterminant, car le fragment d'ARN n'est pas capable de favoriser l'inhibition de l'activité aconitase (Figure III-33). Seule une activation de la fixation au motif IRE, quasi identique à celle observée avec le 2ME, a pu être réalisée avec l'utilisation d'une

quantité équivalente d'éthanol. Ce résultat exclut aussi la possibilité que le 2ME joue le rôle de chélateur du fer pour convertir l'aconitase en protéine fixatrice d'IRE puisque l'éthanol est aussi efficace sans posséder la fonction thiol nécessaire à cette propriété.

L'action de l'éthanol ou du 2ME ne semble pas non plus être due à une modification du pH du milieu, à laquelle les protéines à centre fer-soufre sont sensibles, mais plus certainement à un effet chaotropique sur la protéine, facilitant l'accessibilité du site actif lors des dosages de l'activité de fixation au motif IRE. Au contraire des précédentes, cette explication s'accorde à la nécessité d'une très forte quantité de 2ME ou d'éthanol dans ces dosages pour un effet-solvant et au détriment d'une réaction spécifique avec la protéine.

RECHERCHE DE PROTEINES INTERAGISSANT AVEC LA PROTEINE IRP1 PAR LA TECHNIQUE DU DOUBLE HYBRIDE DANS LA LEVURE.

Un ensemble d'observations suggère que la conversion entre les formes aconitase et fixatrice d'IRE d'IRP1 pourrait dépendre de protéines accessoires. Les éléments suivants contribuent à cette hypothèse :

- La protéine IRP1 est activée par de faibles concentrations de peroxyde d'hydrogène exogène vis à vis de la fixation aux IRE mais pas par le peroxyde d'hydrogène généré à l'intérieur des cellules de fibroblastes murins (Pantopoulos *et coll.* 1997). Ce phénomène d'activation semble être médié par un mécanisme de transduction du signal initié par le peroxyde d'hydrogène. Nos expériences *in vitro* (cf chapitre III-A-3) confirment que le peroxyde d'hydrogène n'active pas directement IRP1.
- La doxorubicine ne provoque pas les mêmes effets sur IRP1 quand elle est appliquée à des cellules en culture ou sur des extraits cellulaires ainsi que sur la protéine recombinante (cf chapitre III-B). Une action via un mécanisme faisant intervenir des effecteurs secondaires est envisageable comme largement documenté avec les anthracyclines (Singal *et coll.* 2000).
- Des traitements drastiques sont nécessaires pour générer la forme d'IRP1 stable dépourvue de métal et active vis à vis de la fixation du motif IRE *in vitro* (Cf chapitre VIII-E-4). Ainsi, l'implication de protéines accessoires facilitant le passage à cette forme active de la protéine est une hypothèse à analyser.

Devant ces possibilités, nous avons essayé d'identifier de tels partenaires protéiques à l'aide de la technique du double hybride dans la levure.

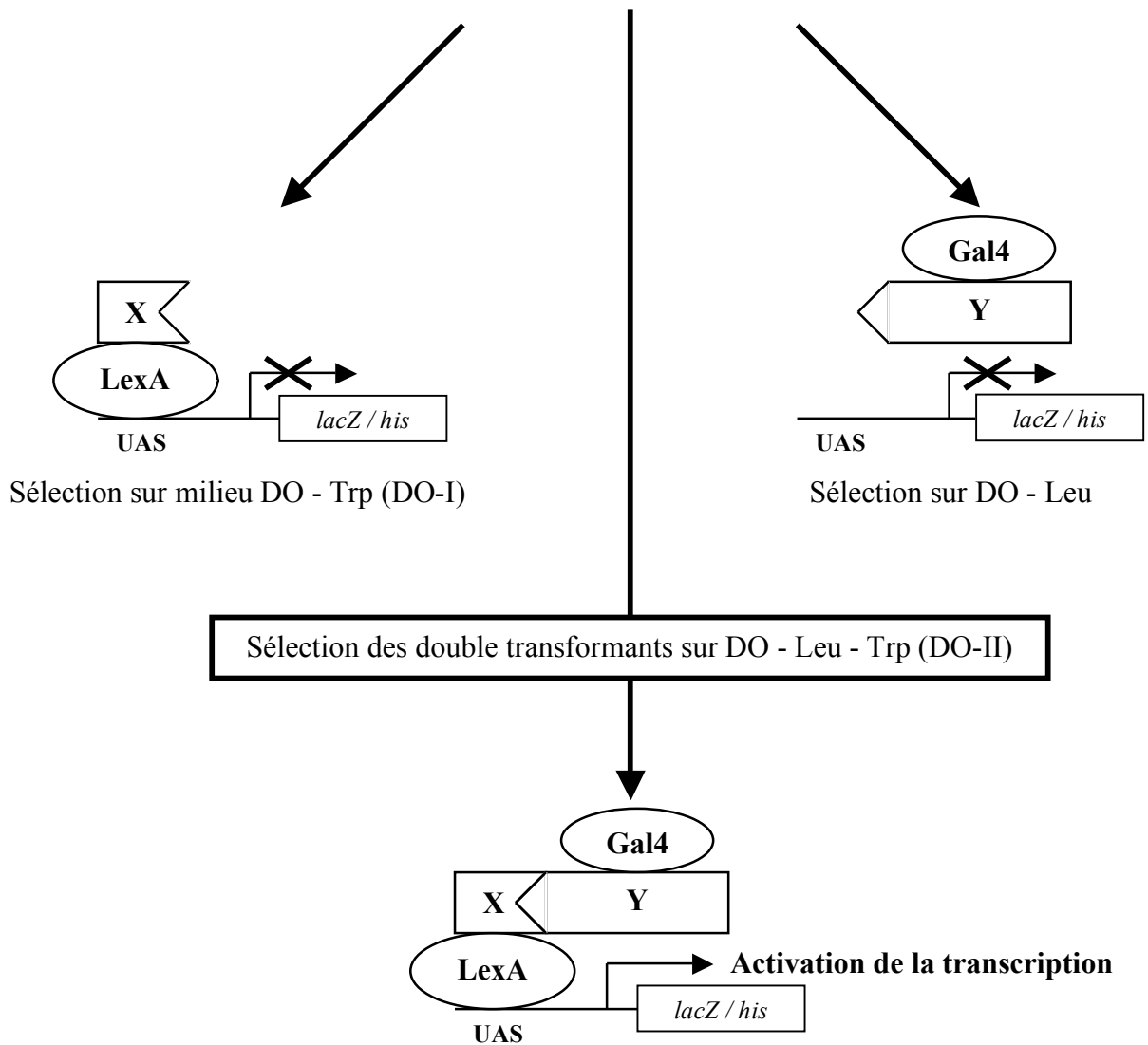
IV-A Principe du système double hybride

Le système double hybride initialement développé (Fields et Song 1989) est une méthode d'étude des interactions protéine-protéine (ou domaines protéiques) par une approche génétique, réalisée *in vivo* dans le noyau de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Le principe de cette technique est basé sur la caractéristique de la transcription des gènes chez la levure qui dépend d'un promoteur assez rudimentaire (la boîte TATA légèrement en amont de la séquence codante) et d'opérateurs adjacents (les *upstream activating sequences*-UAS). Ces deux éléments peuvent aisément être interchangés entre différents gènes (l'opérateur reconnu par LexA utilisé dans nos travaux est même un opérateur bactérien) et la transcription du gène rapporteur est liée à l'action d'un facteur de transcription. De par la nature de l'opérateur régulant l'expression des gènes *his* et *lacZ* dans L40, le fragment LexA codé par le plasmide dérivé de pLEX fournit le site de fixation à l'UAS. Mais ce facteur de transcription n'est efficace qu'en présence d'un domaine activateur, dérivé dans notre cas du facteur de transcription Gal4 de la levure. Celui-ci est constitué de deux domaines, l'un, N-terminal, qui lie spécifiquement certaines séquences de l'ADN et l'autre, C-terminal, qui joue le rôle d'un activateur de la transcription. C'est ce domaine-ci qui est codé par les plasmides dérivés de pGAD. Ainsi, la transcription des gènes rapporteurs *his* et *lacZ* n'est possible que lorsque ces deux domaines sont suffisamment proches dans l'espace, c'est à dire quand les protéines qui leur sont fusionnées interagissent.

L'expérience de double hybride consiste donc à adresser au noyau de la levure deux protéines-fusion. La première contient le domaine liant l'UAS (LexA) et une protéine (ou fragment de protéine) d'intérêt. Cette construction est nommée "appât". La seconde protéine contient le domaine activateur de Gal4 fusionné avec une protéine (ou fragment de protéine) pour laquelle l'interaction avec la protéine d'intérêt doit être analysée. Cette construction est désignée comme la "proie". Si ces deux protéines interagissent, alors la transcription de gènes rapporteurs, facilement analysables, peut être activée (Figure IV-1).

Transformation des levures *Saccharomyces cerevisiae* L40



Sélection sur milieu DO - Trp - Leu - His (DO-III)
Sélection des clones capables d'hydrolyser le X-gal par le produit du gène *lacZ* → coloration bleue

Figure IV-1 : Principe du double hybride.

- Le premier gène rapporteur est *lacZ*, qui permet de révéler l'interaction par la détection de l'activité β -galactosidase des différentes colonies (test X-Gal).
- Le second gène (*his*) permet de sélectionner sur un milieu sans histidine les clones dans lesquels l'interaction appât-proie se produit.

L'appât peut être utilisé pour analyser les interactions avec des cibles particulières, ou bien il peut être utilisé pour sonder une banque d'ADN complémentaire. Dans ce cas, il peut révéler des partenaires éventuels sans connaissance préalable.

Néanmoins quelques précautions sont nécessaires à la réalisation de cette expérience :

- Il faut s'assurer de la non toxicité de la protéine fusion étudiée. Ceci est analysé facilement en observant la capacité de la souche de levure transformée par le plasmide codant pour la construction à se développer sur le milieu sélectif correspondant.
- L'appât ne doit pas pouvoir activer, de lui-même, la transcription. Ce contrôle s'effectue simplement par l'analyse du gène rapporteur *lacZ* dans la souche de levure n'exprimant que l'appât fusionné.

IV-B Résultats

IV-B-1 Construction pLex-T1

A l'aide du plasmide pLEX-T1 (Cf chapitre VIII-G-1), la majeure partie de la protéine IRP1 humaine, les acides aminés 13 à 889 (C-terminal), est synthétisée sous forme de fusion avec le peptide domaine liant l'ADN, LexA. Cette construction est donc à priori en mesure de permettre la détection de tous les partenaires physiologiques, si toutefois ils existent, puisqu'il représente la quasi totalité de la protéine IRP1.

Les extraits cellulaires des souches de levure L40/pLex11 et L40/pLex-T1 ont été préparés (VIII-G-7) et 15 µg ont été analysés sur un gel dénaturant à 10% de polyacrylamide. Ce dernier a été transféré sur membrane de difluorure de polyvinylidène et révélé par immunodétection à l'aide d'anticorps monoclonaux primaires de souris dirigés contre le fragment LexA (0.2 µg/µl) et d'anticorps secondaires de mouton dirigés contre les immunoglobulines de souris, couplés à une activité peroxydase (Cf chapitre VIII-G-8) (Figure IV-2).

Une bande de 22 KDa est détectée dans le puits A correspondant aux extraits de la souche L40/pLEX11. Dans le puits B, correspondant aux extraits cellulaires de la souche L40/pLex-T1, une bande d'environ 120 KDa est visualisée.

La bande détectée dans l'extrait de la souche L40/pLEX11 est compatible avec la taille attendue de la protéine synthétisée par le plasmide pLEX11, à savoir la protéine LexA (25.5 KDa). Dans le cas des extraits de la souche L40/pLEX-T1, la bande observée correspond à la taille attendue (121 KDa) pour la protéine correspondant au fragment LexA fusionné à la protéine IRP1 (13-889 ≈ 96 KDa).

Un dosage de l'activité de fixation au motif IRE en présence de 2% de 2ME a été réalisé avec 10 µg d'extraits cellulaires des souches L40/pLex11 et L40/pLEX-T1, mais aucune bande retardée, correspondant à la formation du complexe IRE / fusion LexA-IRP1, n'est détectable (résultat non montré). Ainsi, bien que synthétisée dans la levure, la protéine de fusion LexA-IRP1 ne semble pas active pour la fixation du motif IRE.

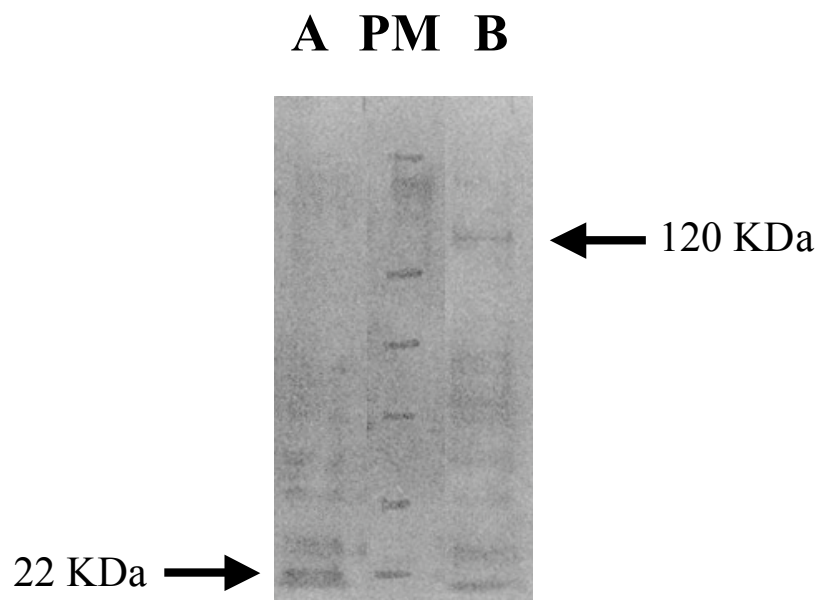


Figure IV-2 : Immunodétection des fusions LexA dans différents extraits de levures.
 Puits A : 15 µg d'extraits de L40/pLex11 ; Puits B : 15 µg d'extraits de L40/pLex-T1.
 PM : Poids moléculaires (SeeBlue™ Plus2 Pre-Stained Standards - NOVEX) : 148 KDa,
 98 KDa, 64 KDa, 50 KDa, 36 KDa et 22 KDa, de haut en bas.

Malgré cette absence d'activité, la construction LexA-T1 a été testée dans l'espoir de découvrir des partenaires physiologiques de IRP1 parmi une banque de protéines de fusion avec le domaine activateur de Gal4. En effet, la protéine de fusion LexA-IRP1 étant totalement synthétisée, elle peut faire l'objet d'interactions avec d'éventuels partenaires et l'absence d'activité de fixation au motif IRE n'est pas un critère suffisant pour ne pas poursuivre cette étude. Cette absence d'activité peut être due à un encombrement stérique lié à la présence du fragment LexA, qui empêche la reconnaissance du motif IRE.

Pour la recherche d'éventuels partenaires, notre choix s'est porté sur une banque d'ADNc de cerveau humain (Human Brain MATCHMAKER cDNA Library - Clontech). En effet, la présence de la protéine IRP1 a été rapportée dans ce tissu (Hu et Connor 1996). De plus, cette banque est composée d'un nombre relativement important de clones indépendants ($1.2 \cdot 10^6$). Enfin, la taille des fragments clonés dans le vecteur pGAD de cette banque est d'une longueur moyenne de 1400 pb dans le domaine 0.6-5.5kbp. Ceci permet la synthèse de protéines suffisamment longues pour être structurées dans une large gamme comprise entre 200 et 1800 résidus.

IV-B-2 Résultats de l'étude double hybride à l'aide de la construction pLex-T1

La souche de levure L40/pLEX-T1 se développe sur milieu DO-I et ne présente pas de couleur bleue lors du dosage X-Gal, démontrant que la construction n'est pas toxique et qu'elle n'active pas d'elle même la transcription de la β -galactosidase.

Malgré une efficacité de transformation de la souche L40/pLEX-T1 par la banque d'ADNc de cerveau humain (20 μ g d'ADN plasmidique) évaluée à 10^6 cfu/ μ g d'ADN sur milieu DO-II, aucune colonie n'a été détectée sur milieu DO-III, même après 5 jours d'incubation. Cette étape de transformation a été renouvelée et malgré une efficacité de transformation similaire, celle-ci conduit au même résultat, à savoir l'absence de colonie capable de se développer sur DO-III.

Ainsi aucun partenaire physiologique n'a pu être mis en évidence à l'aide de la construction correspondant à la fusion de LexA et de la quasi-totalité de la protéine IRP1.

IV-B-3 Construction pLex-F1

Devant l'absence de résultat avec la protéine entière, nous avons réalisé une nouvelle étude double hybride avec une autre construction incluant un fragment de la protéine IRP1.

Les protéines IRP présentent des insertions par rapport à la séquence de l'aconitase mitochondriale. Pour la seconde construction, nous avons choisi d'exprimer une de ces insertions avec le fragment LexA. Le peptide sélectionné, correspondant aux acides aminés 684 à 758, semble important pour la fonction des IRP :

- Il contient la sérine 711 qui a été déterminée comme étant un site de phosphorylation de la protéine IRP1 par la protéine kinase C *in vitro* (Eisenstein *et coll.* 1993).
- Il contient à la fois le peptide 685-689 qui a été impliqué dans la fixation de l'IRE (Kaldy *et coll.* 1999) et les résidus R728, R732 (Kaldy *et coll.* 1999) et R699 (Butt *et coll.* 1996) qui interagissent avec l'IRE.
- Ce fragment de 74 acides aminés est assez long pour adopter un repliement autonome et il s'insère dans une zone de surface de l'aconitase mitochondriale, structurée en hélices et brins antiparallèles avec une partie proche du site d'entrée présumé des substrats.
- Enfin, le fragment choisi est relativement bien conservé entre IRP1 et IRP2 (Figure IV-3).

Ces caractéristiques en font un bon candidat pour la recherche d'éventuel(s) partenaire(s).

IV-B-4 Résultats de l'étude double hybride à l'aide de la construction pLex-F1

Le plasmide pLex-F1, dont la construction est décrite au chapitre VIII-G-2, a été utilisé pour transformer une souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* L40 (Cf chapitre VIII-G-6). La souche L40/pLex-F1 obtenue se développe sur milieu DO-I et ne présente

	690	700	
HumanIRP1	GNIARNSPAARYLTNRGLTPREFNS		
HumanIRP2	GSIARNSAAAKYLTNRGLTPREFNS		
	*.*****.***:*****		
	710	720	730
HumanIRP1	YGSRRGNDAVMARGTFANIRLLNRF		
HumanIRP2	YGARRGNDAVMTRGTFANIKLFNKF		
	:*~***~*****~*~*~*		
	740	750	
HumanIRP1	LNKQAPQTIHLPSGEILDVFDAAER		
HumanIRP2	IGKPAPKTIHFPSGQTLDVFEAAEL		
	:.* **~*****~*****~*****~***		

Figure IV-3 : Alignement de séquence entre l'IRP1 humaine et l'IRP2 humaine dans la région 684-758 de IRP1.
 (* = Identité, : = Similarité)

Nom	X-Gal	Nom	X-Gal	Nom	X-Gal
B1	-	M1	+	S1	-
B2	+	M2	+	S2	+
B3	+	M3	-	S3	+
B4	+	M4	+	S4	+
B5	+	M5	+	S5	+
B6	+	M6	-	S6	+
B7	+	M7	-	S7	-
B8	+	M8	-	S8	-
B9	+	M9	-	S9	-
B10	-	M10	+	S10	-
B11	+	M11	-	S11	-
B12	+	M12	+	S12	-
B13	-	M13	-	S13	-
B14	-	M14	+	S14	-
		M15	-	S15	+
		M16	-	S16	-
		M17	-	S17	+
		M18	+	S18	-
		M19	-		

Tableau IV-1 : Résultats de l'activité X-Gal des 58 candidats initiaux pour l'interaction avec le fragment F1 de IRP1.
(+ = activité β -galactosidase; - = pas d'activité β -galactosidase)

aucune couleur bleue lors du dosage X-Gal, démontrant que la construction n'est pas toxique et qu'elle n'active pas d'elle même la transcription du gène rapporteur.

L'efficacité de transformation de la souche L40/pLEX-F1 par la banque d'ADNc de cerveau humain (30 µg d'ADN plasmidique) a été évaluée à 3×10^6 cfu/µg d'ADN et l'incubation sur milieu DO-III a permis d'isoler, après deux jours d'incubation, 14 grosses colonies à croissance rapide nommées B1 à B14. 19 autres colonies à la croissance plus lente, M1 à M19, ont été prélevées après 3 jours d'incubation et, après 5 jours d'incubation, 18 nouvelles colonies, S1 à S18, ont finalement été conservées pour la poursuite de l'étude, portant le nombre total de colonies à 58.

Celles-ci ont été testées pour leur activité β -galactosidase (Cf chapitre VIII-G-9) (Tableau IV-1), afin d'éliminer celles qui pourraient présenter un phénotype His⁺/LacZ⁻ et ne conserver que les clones His⁺/LacZ⁺.

Seuls les candidats, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, B11, B12, M1, M2, M4, M5, M10, M12, M14, M18, S2, S3, S4, S5, S6, S15 et S17, présentent une couleur bleue caractéristique de la dégradation du X-Gal par la β -galactosidase. Ceci ramène le nombre de candidats à 25 sur les 58 initiaux.

Les plasmides de ces différents candidats ont été purifiés selon le protocole décrit dans le chapitre matériels et méthodes (VIII-G-10). Ces plasmides purifiés, respectivement nommés pGAD-B_n, pGAD-M_n et pGAD-S_n, ont été analysés par PCR à l'aide des oligonucléotides GAD-F et ACT-AS (Tableau VIII-1), flanquant le site de clonage multiple du plasmide pGAD, afin d'amplifier le fragment cloné dans chaque plasmide dérivé de pGAD (Tableau IV-2).

Le fragment amplifié de chaque clone a été digéré par l'enzyme de restriction *Sau3A* (Tableau IV-3) et a permis une identification initiale des doublons par analyse de la taille du fragment amplifié et du profil de digestion.

Nom	Taille (pb)	Nom	Taille (pb)	Nom	Taille (bp)
pGAD-B2	700	pGAD-M1	2000	pGAD-S2	n.a.
pGAD-B3	700	pGAD-M2	2000	pGAD-S3	1200
pGAD-B4	700	pGAD-M4	1300	pGAD-S4	n.a.
pGAD-B5	700	pGAD-M5	1100	pGAD-S5	n.a.
pGAD-B6	2000	pGAD-M10	2000	pGAD-S6	1800
pGAD-B7	700	pGAD-M12	n.a.	pGAD-S15	1800
pGAD-B8	n.a.	pGAD-M14	1900	pGAD-S17	550
pGAD-B9	1500	pGAD-M18	n.a.		
pGAD-B11	n.a.				
pGAD-B12	2000				

Tableau IV-2 : Tailles des fragments amplifiés par PCR des candidats pGAD.

(n.a. : non amplifié)

Nom	Digestion <i>Sau3A</i>	Nom	Digestion <i>Sau3A</i>	Nom	Digestion <i>Sau3A</i>
pGAD-B2	700	pGAD-M1	400 + 200 +120	pGAD-S3	350 + 700
pGAD-B3	700	pGAD-M2	400 + 200 +120	pGAD-S6	350 + ...
pGAD-B4	700	pGAD-M4	1300 + ...	pGAD-S15	350 + ...
pGAD-B5	700	pGAD-M5	1100 + ...	pGAD-S17	550
pGAD-B6	400 + 200 +120	pGAD-M10	2000 + 1200 + 550		
pGAD-B7	700	pGAD-M14	2000 + 700 + 550 + 120		
pGAD-B9	430 + ...				
pGAD-B12	400 + 200 + 120				

Tableau IV-3 : Profil de digestion *Sau3A* des plasmides candidats à l'interaction avec le fragment F1 de l'IRP1 humaine.
(... : petits fragments difficilement analysables)

Les plasmides :

pGAD-B2, pGAD-B3, pGAD-B4, pGAD-B5 et pGAD-B7 ;

pGAD-B6, pGAD-B12, pGAD-M1 et pGAD-M2 ;

pGAD-S6 et pGAD-S15 ;

présentent un fragment amplifié de même taille avec un profil de digestion *Sau3A* identique: ces groupes correspondent donc très probablement chacun à un même clone. Seuls pGAD-B3, pGAD-B12 et pGAD-S6 ont été caractérisés dans la suite des expériences comme représentants de ces ensembles.

Les plasmides pGAD-B9, pGAD-M4, pGAD-M5, pGAD-M10, pGAD-M14, pGAD-S3 et pGAD-S7 sont uniques, avec des tailles de fragment amplifié et des profils de digestion *Sau3A* totalement différents.

Ainsi, les candidats non identiques B3, B9, B12, M4, M5, M10, M14, S3, S6, S17 ont seuls été sélectionnés pour l'étape suivante de l'expérience de double hybride ce qui en ramène le nombre à 10 sur les 58 initiaux.

Les plasmides sélectionnés purifiés des levures ont été utilisés pour transformer des cellules HB101 par électroporation (Cf chapitre VIII-G-11) et celles-ci ont été étalées sur milieu minimum / Agar / 50 µg/ml Ampicilline / 30 µg/ml Streptomycine. La sélection du plasmide dérivé de pGAD (mais pas celle du plasmide dérivé de pLex11) s'effectue grâce à la complémentation du phénotype *leu⁻* des HB101 par le gène *LEU1* codé par le plasmide pGAD, ainsi que la présence d'ampicilline.

Les plasmides isolés des cellules HB101 (Cf chapitre VIII-G-12) ont de nouveau été analysés par PCR et digérés par *Sau3A* pour s'assurer de leur identité et utilisés pour transformer la souche L40/pLEX-F1 de *Saccharomyces cerevisiae*. Les cellules transformées ont été étalées sur boîtes DO-III pour vérifier les interactions entre les deux protéines fusion.

Tous les candidats se sont développés sur le milieu DO-III, confirmant le phénotype His⁺ observé précédemment et un dosage X-Gal a été réalisé (Figure IV-4). A ce niveau de l'étude, seuls deux candidats présentent une coloration bleue : les clones correspondant aux plasmides pGAD-B9 et pGAD-B12. Les candidats B3, M4, M5, M10, M14, S3, S6 et S17 ont donc été éliminés.

Les inserts des deux plasmides pGAD-B9 et pGAD-B12, purifiés de HB101, ont été séquencés. Pour le plasmide pGAD-B9, la séquence de 596 pb de l'extrémité 5' a pu être obtenue à partir de l'oligonucléotide GAD-F, utilisé comme amorce et situé en amont du site d'insertion des fragments dans pGAD (*EcoRI*). Pour le clone pGAD-B12, 573 pb des séquences en 5' et en 3' ont pu être obtenues respectivement à partir des oligonucléotides GAD-F et GAD-R, utilisés comme amorce et flanquant le site d'insertion des fragments dans pGAD (*EcoRI*). Ces différentes séquences ont été utilisées pour cribler la banque de séquences d'ADN à l'aide du logiciel BLAST (Altschul *et coll.* 1997).

La séquence du plasmide pGAD-B9 a permis d'aligner parfaitement 562 de ses bases aux bases 22 à 583 d'une séquence (NM_014458.1) codant pour une protéine humaine au rôle inconnu, mais décrite comme possédant un motif Kelch (Adams *et coll.* 2000). La séquence codante de cette protéine est de 1830 pb. Cette taille est compatible avec la taille du fragment amplifié du plasmide pGAD-B9 autour de 1500 pb. En effet la mesure de la taille du fragment n'est pas très précise et l'impossibilité de séquencer dans la direction 3' → 5' à l'aide de l'oligonucléotide GAD-R semble indiquer la présence d'une séquence poly-A. Ceci suggère que le fragment inséré dans pGAD-B9 est complémentaire de l'ARN complet de la protéine au motif Kelch.

La séquence en 5' obtenue du plasmide pGAD-B12 a permis d'aligner parfaitement 540 de ses bases avec les bases 1203 à 1742 d'une séquence (NM_001103.1) codant pour l' $\alpha 2$ actinine humaine (Beggs *et coll.* 1992). De même, la séquence en 3' a permis d'aligner 299 de ses bases avec les bases 2654 à 2952 de la même séquence (NM_001103.1). La séquence codante de l' $\alpha 2$ actinine humaine, d'une longueur de 2684 pb, débute à la base 174 de NM_001103.1. Le fragment amplifié du plasmide pGAD-B12 présente une taille de 2000 pb et s'aligne seulement à partir de la base 1203 ; le fragment inséré dans le vecteur pGAD est un

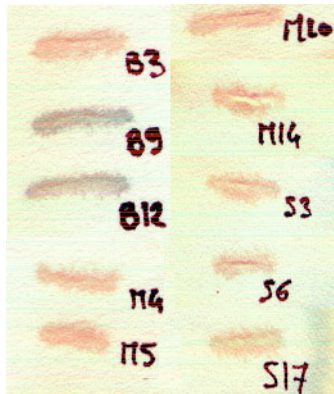


Figure IV-4 : Test d'activité X-Gal des 10 candidats à l'interaction avec le fragment F1 de l'IRP1 humaine.

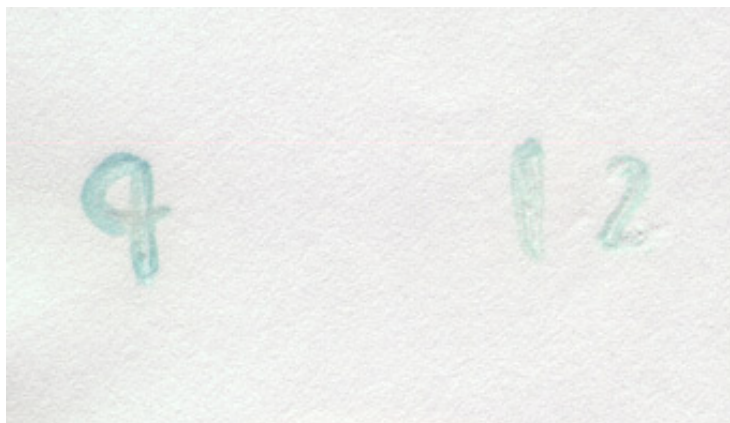


Figure IV-5 : Test d'activité X-Gal des candidats pGad-B9 et pGad-B12 en interaction avec l'appât pLex-lamine.

ADNc incomplet qui ne code donc que pour l'extrémité C-terminale de l' $\alpha 2$ actinine humaine.

La spécificité d'interaction de ces deux candidats vis à vis du fragment F1 d'IRP1 a été vérifiée. Les plasmides pGAD-B9 et pGAD-B12 ont servi à transformer la souche de *Saccharomyces cerevisiae* L40 contenant le plasmide pLex-Lamine. Les deux transformants ont été mis en croissance sur DO-III et l'activité β -galactosidase mesurée (Figure IV-5).

Les levures L40/pLEX-Lamine/pGAD-B9 et L40/pLEX-Lamine/pGAD-B12, tout comme L40 contenant pLEX-F1 et, soit le plasmide pGAD-B9, soit le plasmide pGAD-B12, se développent sur milieu DO-III et hydrolysent le X-Gal pour donner une coloration bleue (Figure IV-5).

Les fusions codées par les plasmides pGAD-B9 et pGAD-12 entrent donc en interaction avec la lamine. Elles correspondent très probablement à des "faux positifs" dont les interactions détectées avec le fragment F1 de la protéine IRP1 sont non spécifiques.

IV-C Discussion

L'étude double hybride utilisant la protéine entière IRP1 comme appât n'a pas révélé de protéine proie codée par l'ADNc de cerveau humain.

Pourtant, par immunodétection à l'aide d'anticorps primaires dirigés contre la protéine LexA, une bande à 121 KDa dans les extraits de levure L40/pLex-T1, correspondant à la taille attendue pour la protéine de fusion entre LexA et le fragment 13-889 de IRP1, a démontré que la protéine de fusion LexA-T1 est bien synthétisée dans la levure, quoique celle-ci ne présente pas d'activité de fixation au motif IRE.

La synthèse de la protéine fusion LexA-IRP1(13-889) n'est pas toxique pour la levure, donc l'absence d'interaction entre cette fusion et celles impliquant la banque d'ADNc permettant l'expression du gène *HIS* dans les expériences de double-hybride laisse deux possibilités :

- Soit IRP1 n'est pas une protéine interagissant assez fortement avec d'autres protéines.

- Soit ses propriétés n'en font pas un bon appât dans ce type d'expérience. En particulier, il se pourrait que l'encombrement du gros domaine IRP1 empêche la fixation de LexA sur son site ADN. De même, cette proximité des fragments peut expliquer l'absence d'activité de fixation au motif IRE de la protéine de fusion.

IRP1 étant une protéine constituée de quatre domaines globulaires, par référence à la structure de l'aconitase mitochondriale, il est possible d'imaginer que d'éventuels partenaires d'IRP1 interagissent avec l'un d'entre eux pour moduler les propriétés d'IRP1. Dans cette logique, un peptide appât, correspondant aux acides aminés 684-758 présent sur IRP1, modélisé en surface et potentiellement structuré, avec un homologue dans IRP2 mais absent de l'aconitase mitochondriale, a été sélectionné pour une nouvelle étude double hybride.

L'expérience a permis de mettre en évidence 2 candidats potentiels pour l'interaction avec la protéine IRP1 sur les 58 colonies initialement sélectionnées.

Le séquençage des plasmides correspondant a permis d'identifier une protéine humaine mal caractérisée possédant un motif Kelch et un fragment C-terminal de l' $\alpha 2$ actinine humaine.

Le motif Kelch (Adams *et coll.* 2000) est formé par la succession de plusieurs segments de 44 à 56 acides aminés, qui s'organisent en feuillets de 4 brins β antiparallèles. La répétition de ce motif se traduit par la formation d'une structure tridimensionnelle en forme d'hélice de bateau, nommée *β -propeller* en anglais. Ce motif est rencontré dans diverses protéines aux multiples fonctions : interaction avec le cytosquelette, implication dans les phénomènes de morphogenèse, expression des gènes, etc... Dans la plupart des cas, le motif Kelch joue un rôle dans les interactions entre protéines.

L'alignement de la séquence de cette protéine inconnue contre une banque de protéines à l'aide du logiciel BLAST permet de localiser la répétition des 6 segments dans la partie C-terminale, ainsi qu'un domaine BTB (POZ) (Bradwell et Treisman 1994) dans la partie

N-terminale. Le domaine BTB est aussi impliqué dans les interactions protéine-protéine et notamment la formation d'hétérodimères.

La seconde protéine identifiée est la chaîne $\alpha 2$ de l'actinine (Beggs *et coll.* 1992). Le rôle de cette protéine est primordial dans les muscles. Sous forme dimérique, elle lie entre eux les filaments d'actine en formant les disques Z des fibres musculaires. Elle existe aussi dans d'autres types cellulaires dans un rôle de maintien du cytosquelette, sous une forme dépendante du calcium, en interagissant avec de nombreuses protéines.

L'interaction détectée entre ces fusions et celle réalisée avec la lamine contribue à renseigner sur la spécificité de l'interaction découverte avec la construction contenant l'appât. Le dosage effectué avec L40/pLEX-lamine/pGAD-B9 et L40/pLEX-lamine/pGAD-B12 étant positif, il est très probable que les interactions entre le fragment F1 de la protéine IRP1 et la protéine au motif Kelch de pGAD-B9 ou le fragment de l' $\alpha 2$ -actinine de pGAD-B12 sont non-spécifiques.

IV-D Conclusion

Aucune des deux constructions testées dans cette étude par double hybride de la protéine IRP1, n'a permis de découvrir des partenaires physiologiques en utilisant une banque d'ADNc de cerveau humain.

La construction correspondant à la protéine entière, qui est la plus intéressante puisqu'elle doit en théorie permettre la détermination de la totalité des partenaires possibles, n'a pas donné de résultat, peut-être par un défaut d'activité de fixation à l'ADN.

La seconde construction, correspondant à un fragment propre aux IRP, a permis d'isoler deux protéines synthétisées à partir d'ADNc de cerveau humain, une protéine possédant un motif Kelch et un fragment de l' $\alpha 2$ -actinine. Mais ces protéines se sont révélées être des partenaires non spécifiques du peptide 684-758 de IRP1 au vu des résultats du test avec la construction pLex-Lamine et de la nature même de ces candidats : une protéine interagissant avec de nombreuses protéines via différents domaines (Kelch et BTB) et un fragment d'une autre protéine qui possède aussi la capacité d'interagir avec diverses protéines.

Néanmoins l'existence de partenaires physiologiques n'est pas nécessairement remise en cause par l'absence de résultats de notre étude. En effet, il a été récemment rapporté qu'une partie non négligeable des protéines cytosoliques, en particulier les monomères, ne donne pas de cible bien nette dans les expériences de double hybride (Uetz *et coll.* 2000).

La poursuite de cette étude à l'aide d'autres moyens mieux adaptés sur la base de nos efforts initiaux pourrait permettre la mise en évidence de partenaires corroborant certaines hypothèses, comme par exemple l'existence d'un mécanisme de phosphorylation de la protéine par une kinase à identifier.

Pour cela, l'utilisation de systèmes double hybride développés dans la bactérie (Hu *et coll.* 2000) peuvent se montrer plus efficaces, notamment grâce à l'absence de compartimentation de l'expérience.

DOSAGE DE L'ACTIVITE DE FIXATION AU MOTIF IRE PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE

La méthode de dosage de l'activité de fixation au motif IRE par retard sur gel de polyacrylamide, utilisée en routine au cours de cette thèse (Cf chapitre VIII-F-5), présente l'avantage de ne nécessiter qu'une très faible quantité de matériel biologique, grâce à la forte sensibilité apportée par le marquage radioactif de la sonde d'ARN contenant le motif IRE. Ainsi, nous avons pu régulièrement tester l'activité de fixation au motif IRE de différents aliquotes en utilisant moins de 10 ng de protéine recombinante pure.

Néanmoins, cette technique n'est pas exempte de quelques inconvénients. L'usage de la radioactivité exige des précautions particulières. La production de grandes quantités de sonde IRE n'est pas pratique à cause de la courte demi-vie des radio-isotopes utilisés (25 jours pour le ^{33}P , 14 pour le ^{32}P). Le temps nécessaire à la réalisation du dosage est à peu près le même quelque soit le nombre d'échantillons traités avec la limite du nombre de puits disponibles sur le système d'électrophorèse utilisé. Le gel doit être séché puis exposé (en pratique, une nuit) pour révéler les bandes radioactives. Enfin, ce dosage réclame de nombreuses interventions de l'opérateur et ne peut pas être facilement automatisé.

Nous avons donc tenté de mettre au point une nouvelle méthode de détection de l'activité de fixation des IRP au motif IRE en substituant le marquage radioactif de l'ARN par un fluorophore et en séparant l'IRE lié aux IRP de l'IRE libre par électrophorèse capillaire.

V-A L'électrophorèse capillaire

Le principe de l'électrophorèse capillaire (Jorgenson and Lukacs 1981) s'appuie sur une des propriétés de ces fins tubes de silice. Ceux-ci présentent au niveau de la face interne une majorité de charges négatives dues aux groupements silanolates formant le capillaire (Figure V-1-A). Une partie des cations contenus dans le tampon de séparation neutralisent ces groupements anioniques (Figure V-1-B). Lors de l'application d'un champ électrique aux extrémités du capillaire, les cations du solvant migrent en direction de la cathode en entraînant les molécules d'eau, créant ainsi un flux de tampon le long du capillaire, nommé flux électro-osmotique (Figure V-1-C).

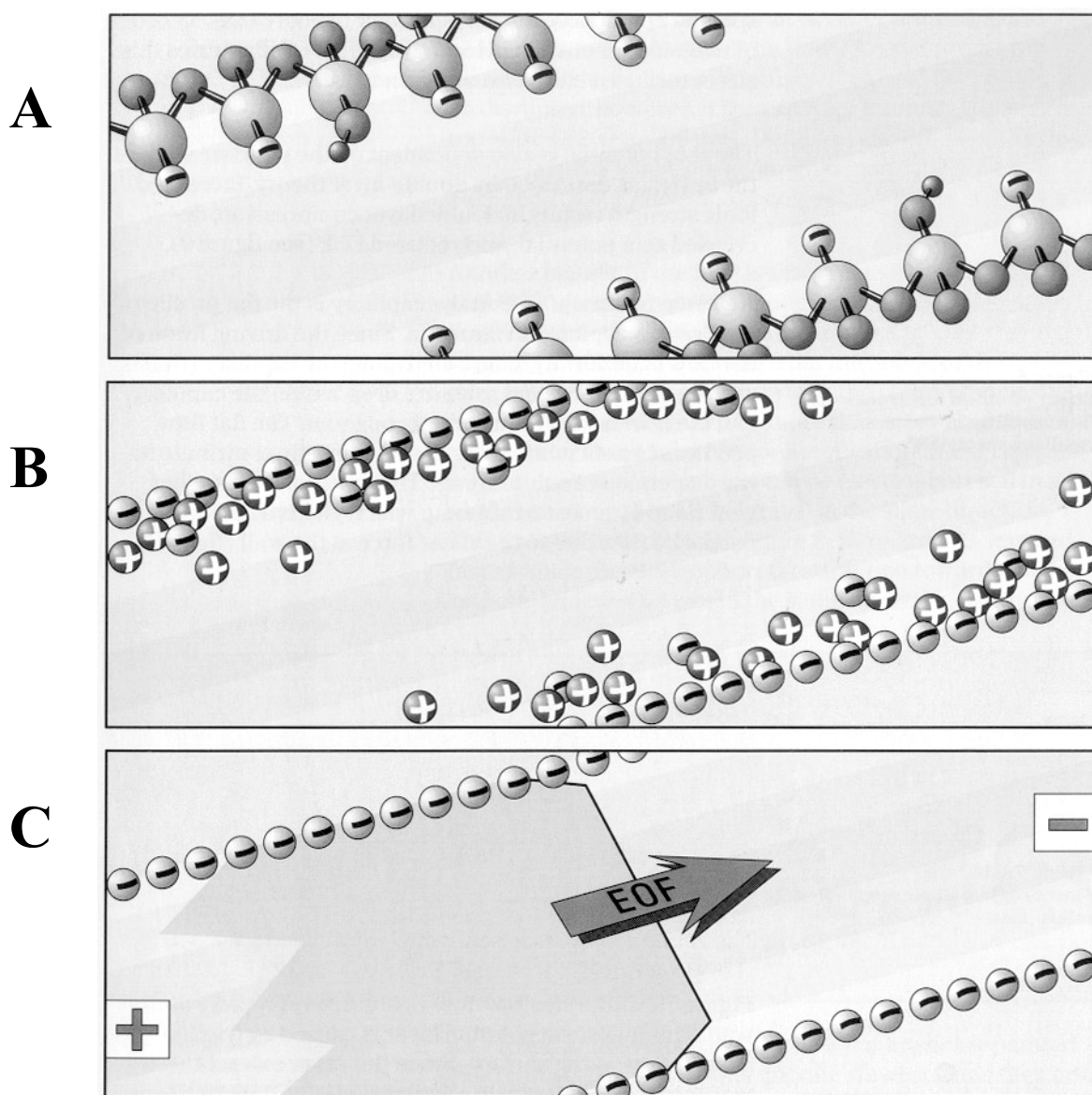


Figure V-1 : Principe de l'électrophorèse capillaire (Heiger 1992).

A : paroi du capillaire (groupement silanolates); B : équilibre des charges de la paroi du capillaire par les charges du tampon; C : Application d'un champ électrique de part et d'autre du capillaire, génération du flux électro-osmotique (OEF).

L'échantillon à analyser est injecté à l'extrémité anodique du capillaire. L'application du champ électrique de part et d'autre de ce même capillaire permet aux différentes espèces contenues dans l'échantillon d'être séparées selon leur charge et leur taille, comme lors d'une électrophorèse classique, mais l'association du flux électro-osmotique permet l'élution des anions, non pas vers l'anode mais vers la cathode grâce au déplacement du tampon. Il en résulte une séparation et l'élution de toutes les espèces contenues dans l'échantillon, mis à part les espèces neutres qui ne sont pas séparées les unes des autres et migrent à la vitesse du flux électro-osmotique (Figure V-2).

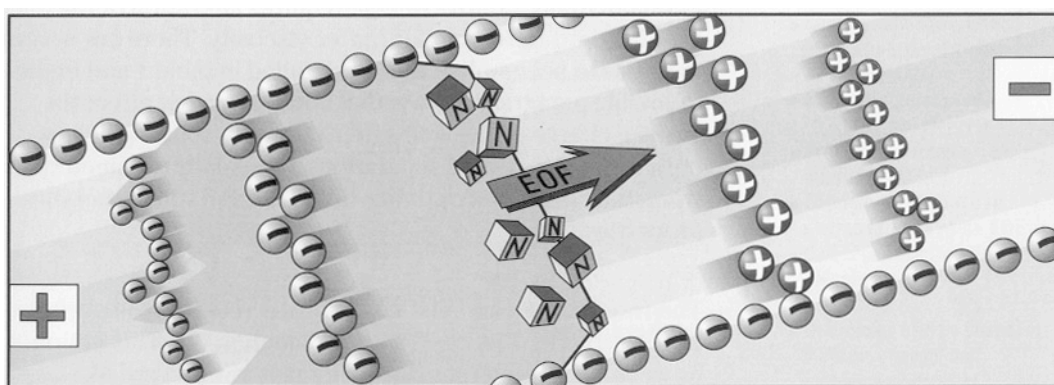


Figure V-2 : Séparation des solutés par électrophorèse capillaire (Heiger 1992).

(EOF) : Flux électro-osmotique, + : espèces cationiques, - : espèces anioniques,

N : espèces neutres.

Enfin, une fenêtre est pratiquée près de l'extrémité cathodique du capillaire et permet la détection des solutés par spectro(fluoro)métrie.

V-B Choix du fluorophore

Afin d'approcher le seuil de détection très bas permis par l'utilisation des radio-isotopes, nous avons choisi de modifier le fragment d'ARN par un groupement fluorescent. L'ARN pourrait être détecté sans modification, par la mesure de l'absorbance des nucléotides à 260 nm, mais cette méthode n'est ni très sensible ni sélective dans un mélange tel qu'un

extrait cellulaire. La présence d'un groupement fluorescent sur le motif IRE peut augmenter la sensibilité et offre la discrimination permise par une excitation sélective du fluorophore.

La synthèse d'une sonde IRE *in vitro* à l'aide de nucléotides modifiés par un groupement fluorescent, par homologie avec la synthèse radioactive, est une méthode envisageable, mais la reconnaissance du(des) nucléotide(s) modifié(s) par l'ARN polymérase risque d'être compromise par la présence du groupement fluorescent et conduire à une baisse du rendement de synthèse, voire à une inhibition de cette synthèse. De plus, l'IRE formant un motif en tige boucle, une sonde ainsi synthétisée peut ne pas se structurer correctement à cause de l'encombrement stérique généré par la présence des groupements fluorescents. Enfin, même si l'ARN se replie comme attendu, la reconnaissance par les IRP n'est pas assurée: en effet, la protéine interagissant de manière spécifique avec certaines bases, notamment la cytosine non appariée sur la tige et une bonne partie de la boucle (Leibold *et al.* 1990, Harrell *et al.* 1991, Bettany *et al.* 1992), le fluorophore peut interférer dans cette reconnaissance.

Nous avons donc décidé de réaliser le marquage fluorescent d'une sonde IRE pré-synthétisée à une extrémité du fragment d'ARN et donc moins susceptible de perturber la reconnaissance par la protéine IRP.

La sonde IRE utilisée au cours de cette thèse présente une extrémité 5' phosphate qui n'est pas appariée (Cf chapitre VIII-F-2). Nous avons donc décidé de modifier spécifiquement cette position à l'aide d'un chromophore fluorescent dérivé de la fluorescéine, l'Oregon Green 488 cadaverin (Figure V-3). Ce composé présente, comme la fluorescéine, un maximum d'absorption à 488 nm compatible avec la longueur d'onde d'excitation du laser dont est équipé le détecteur de l'appareil d'électrophorèse capillaire. Ceci assure une utilisation optimale de l'intensité du faisceau d'excitation. Le maximum d'émission de l'Oregon Green 488 cadaverin se situe à 520 nm et son intensité de fluorescence est plus élevée que celle de la fluorescéine. De plus, il présente un pKa plus bas que son précurseur, ce qui permet d'obtenir une intensité de fluorescence maximale aux pH physiologiques utilisés.

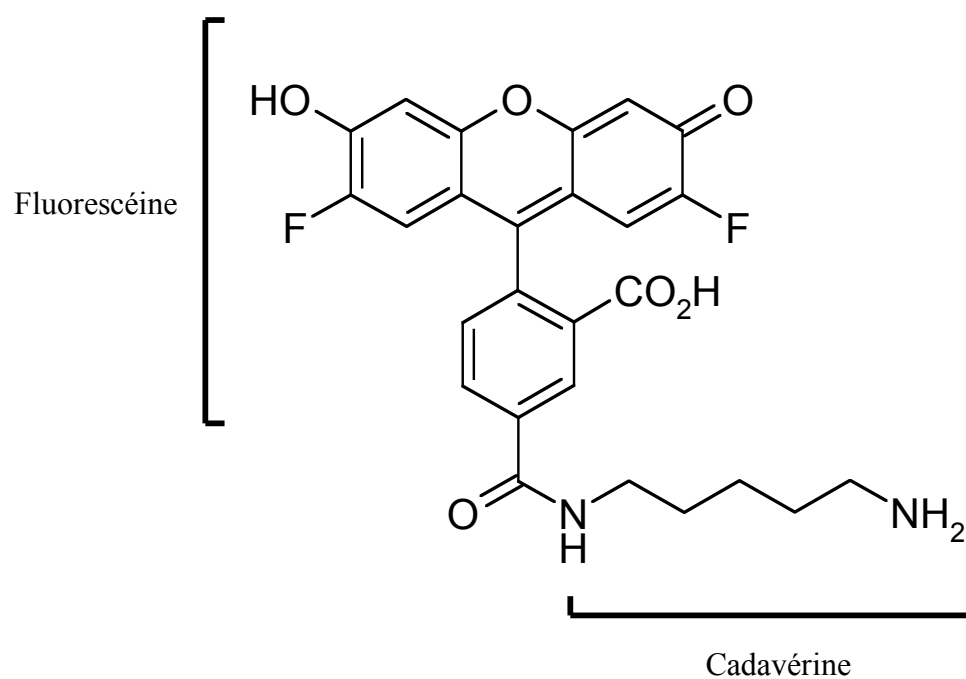


Figure V-3 : Oregon Green 488 Cadaverin.

V-C Résultats

V-C-1 Modification chimique de la sonde IRE

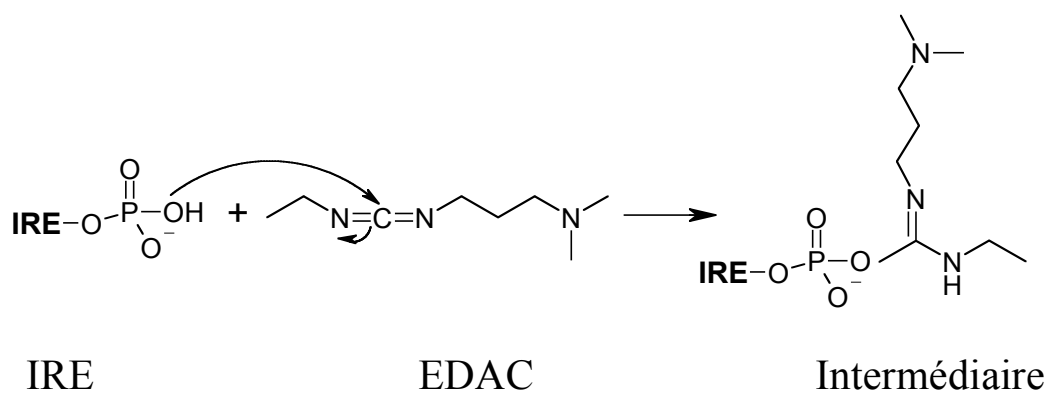
La modification de la sonde IRE, s'effectue par la formation d'une liaison phosphoramidate sur la fonction amine libre de la molécule de cadavérine branchée sur le fluorophore. La cadavérine joue aussi le rôle d'espaceur entre le fluorophore et le nucléotide, grâce à sa chaîne à 5 carbones. Cette géométrie peut éviter l'interaction entre la molécule marquée (ici, en particulier les bases des ribonucléosides) et le noyau poly-aromatique du fluorophore susceptible de diminuer sa fluorescence.

Cette liaison phosphoramidate a été formée en faisant réagir la sonde IRE et le chromophore selon le protocole décrit dans le chapitre matériel et méthodes (VIII-H-1). La réaction, en deux étapes, s'effectue à l'aide d'EDAC, un composé permettant la réticulation sans espaceur d'une amine et d'un carboxylate ou d'un phosphate.

La première étape consiste en l'activation du 5' phosphate de l'IRE par l'EDAC (Figure V-4-A). L'intermédiaire généré subit, dans une seconde étape, une attaque nucléophile de la part de l'amine primaire libre de la cadavérine sur l'atome de phosphate et forme la liaison phosphoramidate donnant l'IRE modifié, nommé Oregon-IRE, et une urée substituée (Figure V-4-B).

L'Oregon Green 488 cadaverin présente une couleur orangée, qui est conservée pour l'Oregon-IRE. La migration de l'IRE modifié sur le gel dénaturant de polyacrylamide, utilisé pour sa purification, a donc pu être facilement suivie. Sur ce gel dénaturant, la migration de l'Oregon-IRE n'est pas sensiblement différente de celle de l'IRE non modifié.

A



B

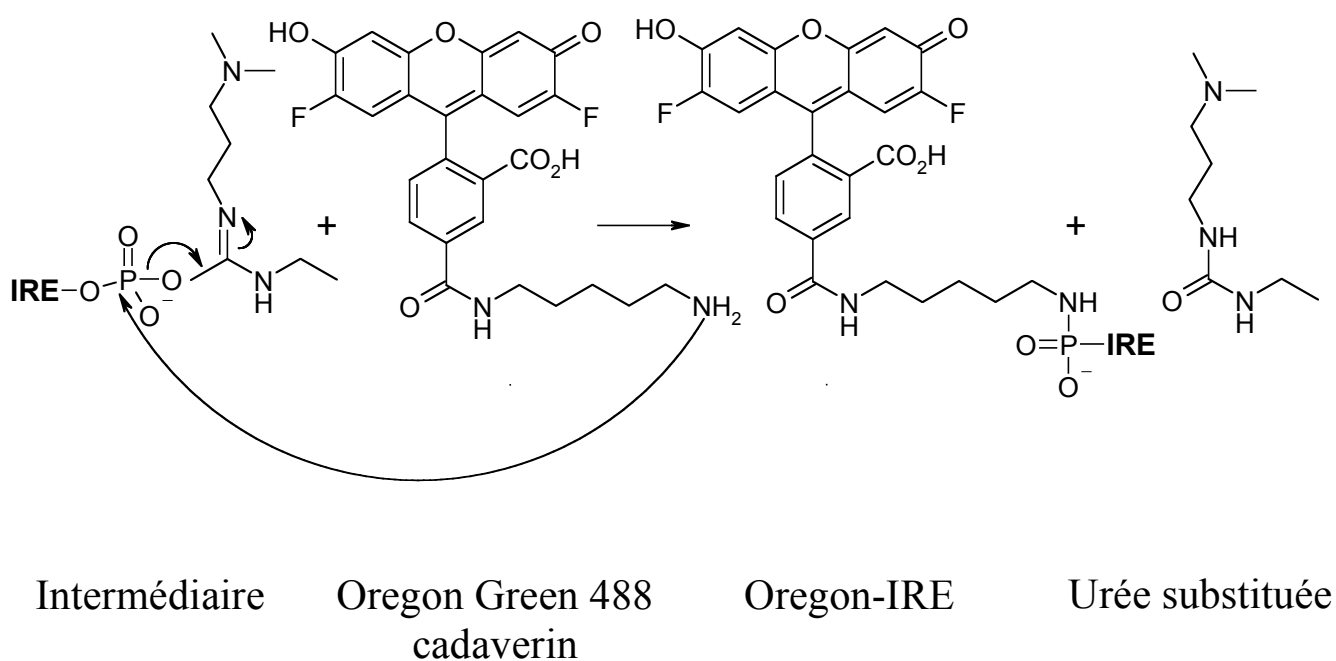


Figure V-4 : Réaction de modification de la sonde IRE par l'Oregon Green 488 Cadaverin.

V-C-2 Propriétés Spectroscopiques de la sonde Oregon-IRE

Le spectre UV-visible de la solution d'Oregon-IRE a été comparé à celui du fluorophore seul (Figure V-5). Proportionnellement à l'absorbance à 488 nm, l'absorbance à 260 nm de l'Oregon-IRE est plus de treize fois plus élevée que celle de l'Oregon Green 488 cadaverin.

En supposant que l'absorbance du fluorophore fixé sur l'ARN n'est pas modifiée, on peut calculer que la solution d'Oregon-IRE de la figure V-5 contient 23 μM d'Oregon Green 488 cadaverin. En ajustant les valeurs d'absorbance à 488 nm des deux composés et éliminant la contribution du fluorophore à 260 nm, l'absorbance à 260 nm due à l'ARN est de 0.74 pour une cuve de 1 mm, ce qui représente 18 μM d'IRE.

Malgré les approximations de ces calculs, les concentrations en Oregon Green 488 cadaverin et en IRE dans la solution d'Oregon-IRE sont très proches et le rendement de la réaction de fixation du fluorophore sur l'ARN avoisine 100%.

Les spectres de fluorescence de 180 nM d'Oregon-IRE et de 20 nM de fluorophore ont été comparés (Figure V-6).

L'Oregon Green 488 cadaverin présente une forte émission de fluorescence à 520 nm conformément aux caractéristiques du produit, tandis que l'Oregon-IRE présente un maximum d'émission de fluorescence décalé vers 529 nm, moins intense que la solution à 20 nM d'Oregon Green 488 cadaverin : 3.9×10^4 photons/s contre 5.1×10^5 photons/s.

Ainsi l'émission de fluorescence de l'Oregon-IRE est environ 120 fois plus faible que celle du chromophore isolé, sans doute par un effet de diminution de l'intensité de fluorescence (*quenching*) engendré par interaction entre le groupement fluorescent et une ou plusieurs bases du polynucléotide.

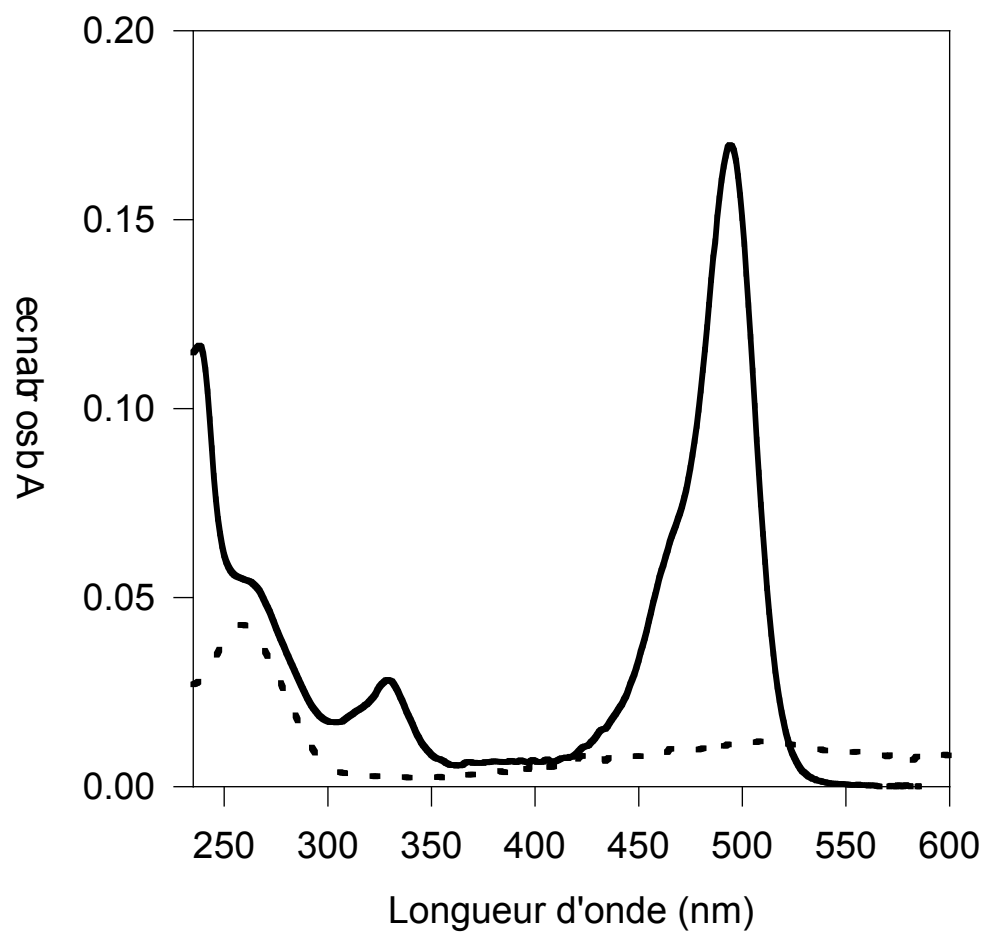


Figure V-5 : Spectres UV-visible de l'Oregon Green Cadaverin (trait plein) et de l'Oregon-IRE (pointillés).

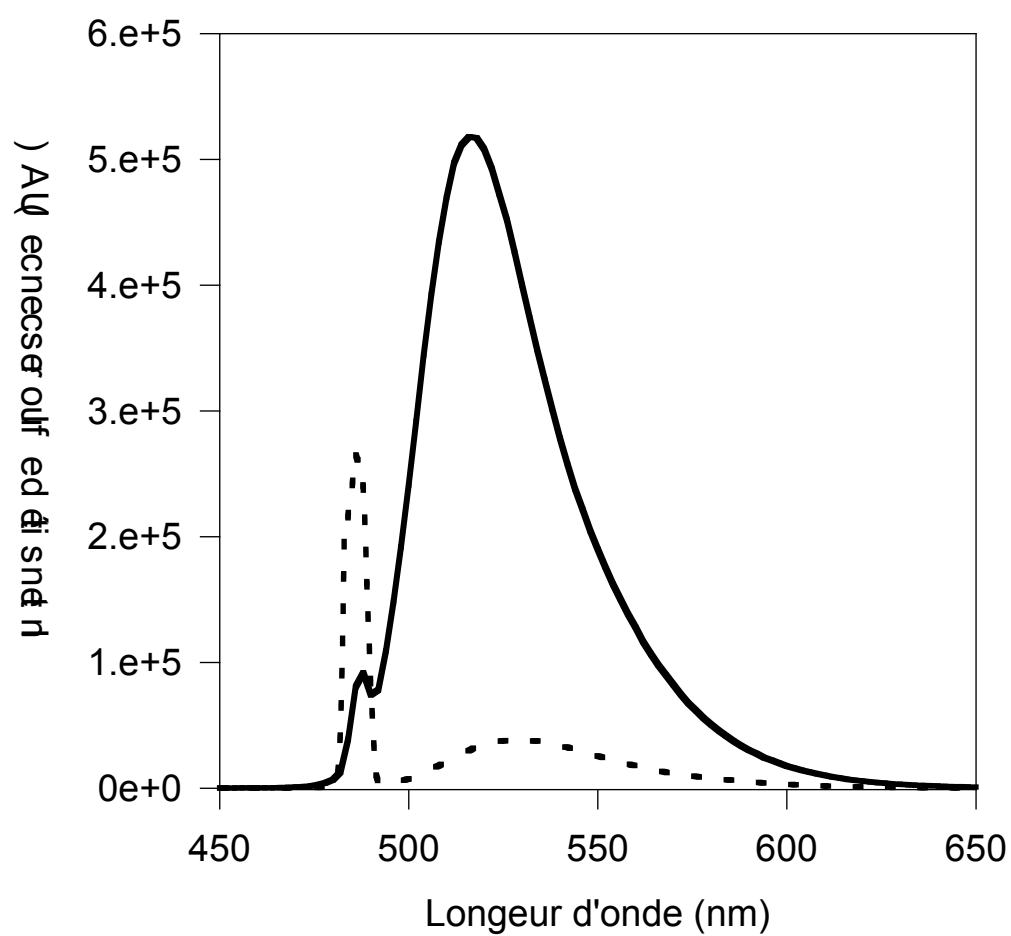


Figure V-6 : Spectres de fluorescence de 180 nM d'Oregon-IRE (pointillés) et 20 nM d'Oregon Green 488 cadaverin (trait plein).

V-C-3 Capacité de reconnaissance de la sonde Oregon-IRE par les IRP

La sonde Oregon-IRE obtenue doit toujours être capable de lier les IRP. Afin de vérifier cette activité, une expérience de compétition avec une sonde IRE radioactive a été réalisée.

Pour cela, une quantité constante de protéine rhIRP1 (300 ng, 3pmol), en présence de 2% de 2ME, a été incubée avec des concentrations croissantes d'Oregon-IRE (0 à 70 pmole) et une quantité fixe (5 pmol) d'IRE radioactive. L'évolution de l'intensité de la bande retardée en fonction de la quantité de d'Oregon-IRE est représentée en figure V-7. Plus la concentration d'Oregon-IRE est élevée, plus l'intensité de la bande retardée diminue, démontrant bien une compétition entre les deux sondes d'ARN et la capacité de l'Oregon-IRE de fixer la protéine IRP1. Le K_d de l'Oregon-IRE pour l'IRP1 a cependant été estimé à plus de 25 fois celui de l'IRE marquée de manière radioactive.

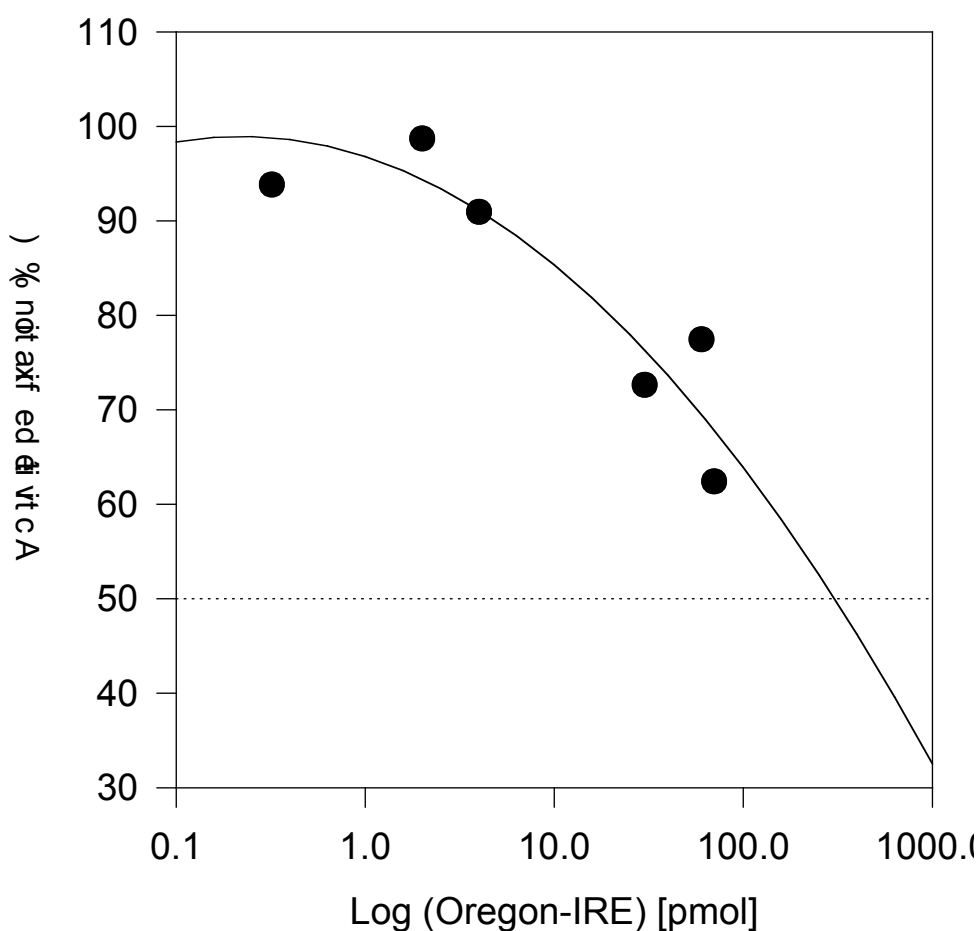


Figure V-7 : Compétition entre IRE et Oregon-IRE

V-C-4 Dosages CEMSA (*Capillary Electrophoresis Mobility Shift Assay*)

Malgré la perte d'affinité de la sonde Oregon-IRE pour les IRP et la perte de fluorescence qui risquent de compromettre la sensibilité de la nouvelle méthode de dosage, nous avons réalisé quelques essais de séparation de mélanges IRP1/Oregon-IRE par électrophorèse capillaire pour tenter de valider la méthode de séparation.

Pour cela, les différentes solutions à analyser ont été injectées et séparées dans un capillaire de silice nu, en suivant le protocole décrit dans le chapitre matériels et méthodes (VIII-H-2).

La séparation a été réalisée dans le tampon utilisé pour la réaction d'interaction entre la protéine et l'ARN (10 mM HEPES-OH pH 7.6, 3 mM MgSO₄, 40 mM KCl, en eau traitée DEPC), afin de minimiser la dissociation du complexe ARN/protéine.

Une première injection d'une solution de 20 nM d'Oregon Green 488 cadaverin a permis, après séparation, d'obtenir l'électrophérogramme présenté en figure V-8. Il se caractérise par un pic unique de forte intensité de fluorescence à un temps de rétention de 12.4 minutes.

Pour comparaison, la sonde Oregon-IRE a été dénaturée à 85°C durant 2 minutes puis mise en présence de 2% de 2ME et 0.05 unité/μl d'inhibiteur de RNase. La solution a été injectée et la séparation a permis d'obtenir l'électrophérogramme présenté en figure V-9. Cet électrophérogramme se caractérise par 2 pics majeurs à 10.9 et 17.1 minutes de temps de rétention, ainsi qu'un pic large centré autour de 16.5 minutes de temps de rétention. Les intensités mesurées sont beaucoup plus faibles que celle mesurée précédemment pour le fluorophore seul, malgré la plus forte concentration d'Oregon-IRE.

La multiplicité des bandes de fluorescence tend à démontrer que la solution injectée n'est pas composée d'une seule forme de l'Oregon-IRE, mais que d'autres formes ou espèces peuvent être présentes. La nature de ces différents composés n'est pas facilement analysable en l'état (par exemple, notre système électrophorétique n'est pas couplé à une autre méthode de séparation/analyse comme la spectrométrie de masse), mais des fragments d'ARN de

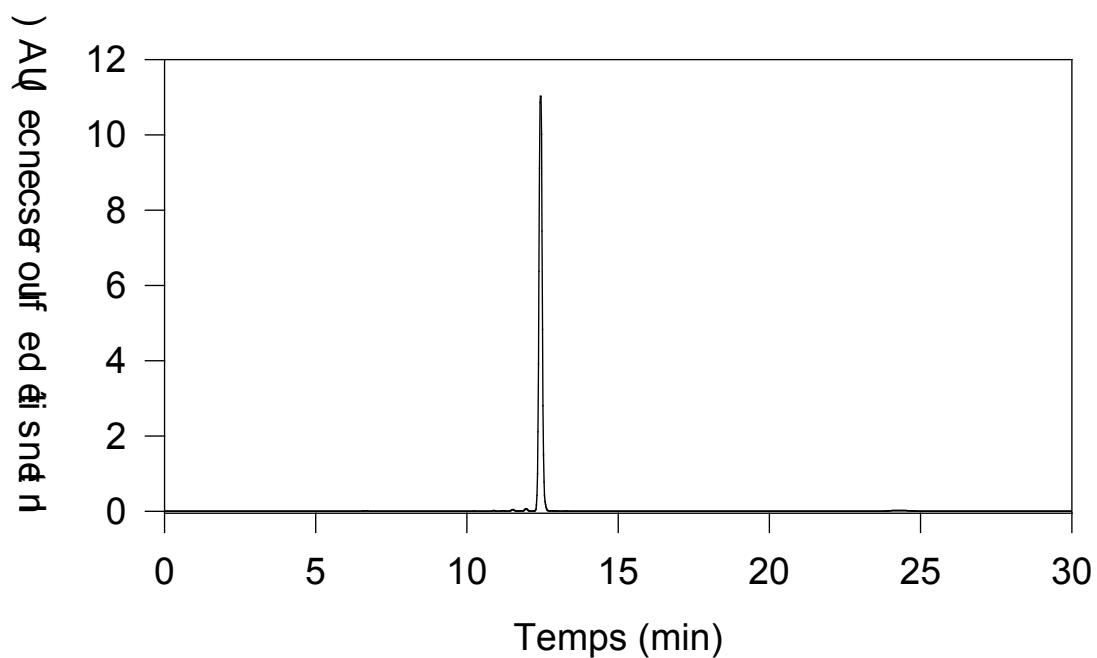


Figure V-8 : Electrophérogramme de 20 nM d'Oregon Green 488 Cadaverin.
Injection : 5 secondes - Séparation : 20 KV - Capillaire nu.

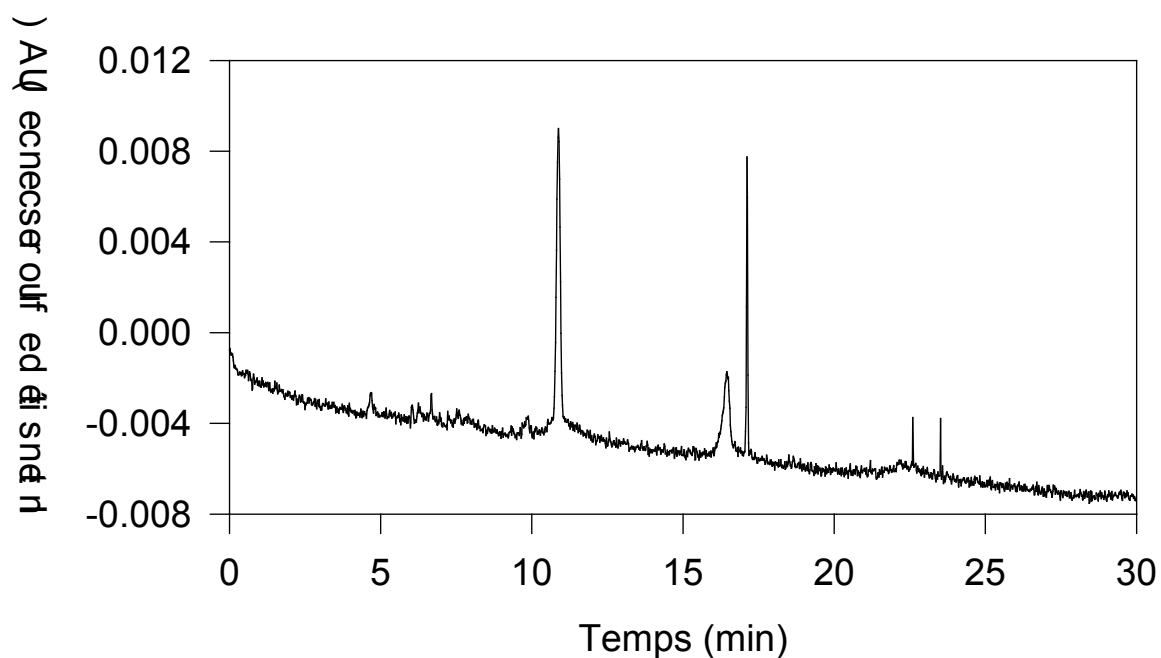


Figure V-9 : Electrophérogramme de 50 nM d'Oregon-IRE en présence de 2% de 2ME et 0.05 unité/ μ l d'inhibiteur de RNase.
Injection : 5 secondes - Séparation : 20 KV - Capillaire nu

longueurs légèrement variables, ou des motifs mal repliés ou au repliement incomplet peuvent expliquer ces différents pics fluorescents.

L'Oregon-IRE a été mélangé avec la protéine rhIRP1 à une stœchiométrie de 2:1 (IRE:IRP1). L'injection puis la séparation de cette solution ont permis d'obtenir l'électrophérogramme présenté en figure V-10. De nouveau, 2 pics majeurs à des temps de rétention similaires à ceux de l'électrophérogramme précédent, sont observés à 11.5 et 16.1 minutes. Un pic large est visible à un temps de rétention de 8 minutes, ainsi qu'un autre de plus faible intensité à 15 minutes.

Les pics à 16.2 et 15 minutes de temps de rétention voient leur intensité diminuer par l'ajout de protéine et peuvent correspondre à différentes formes de l'Oregon-IRE libre.

L'intensité du pic à 11.5 minutes n'évolue pas par rapport au pic observé lors de l'injection de l'Oregon-IRE sans protéine (Figure V-9, pic à 10.9 minutes). Le temps de rétention de ce pic est différent de celui du fluorophore seul (Figure V-8) et ne correspond donc pas à cette espèce. L'invariance de l'intensité du pic, tend à démontrer que ce pic provient d'une forme de la sonde Oregon-IRE qui n'est pas reconnue de manière efficace par la protéine.

L'apparition du pic à 8 minutes, inexistant en absence de protéine, est un bon candidat pour le complexe ARN/protéine, même si lors d'une électrophorèse conventionnelle, un tel complexe serait attendu à un temps de rétention plus élevé que celui de l'IRE libre.

Afin d'analyser plus avant ces différents pics, l'Oregon-IRE a été saturé par un excès de rhIRP1 avec une stœchiométrie de 1:2 (IRE:IRP1). La solution a ensuite été injectée et séparée. L'électrophérogramme correspondant est présenté sur la figure V-11. Ce dernier électrophérogramme se caractérise par un seul pic à un temps de rétention de 12 minutes, dont l'intensité n'évolue pas par rapport aux deux précédentes injections (10.9 minutes et 11.5 minutes). Ceci confirme l'hypothèse selon laquelle ce pic correspond à une forme non reconnue par la protéine IRP1 de la sonde IRE modifiée par le fluorophore Oregon Green 488 cadaverin.

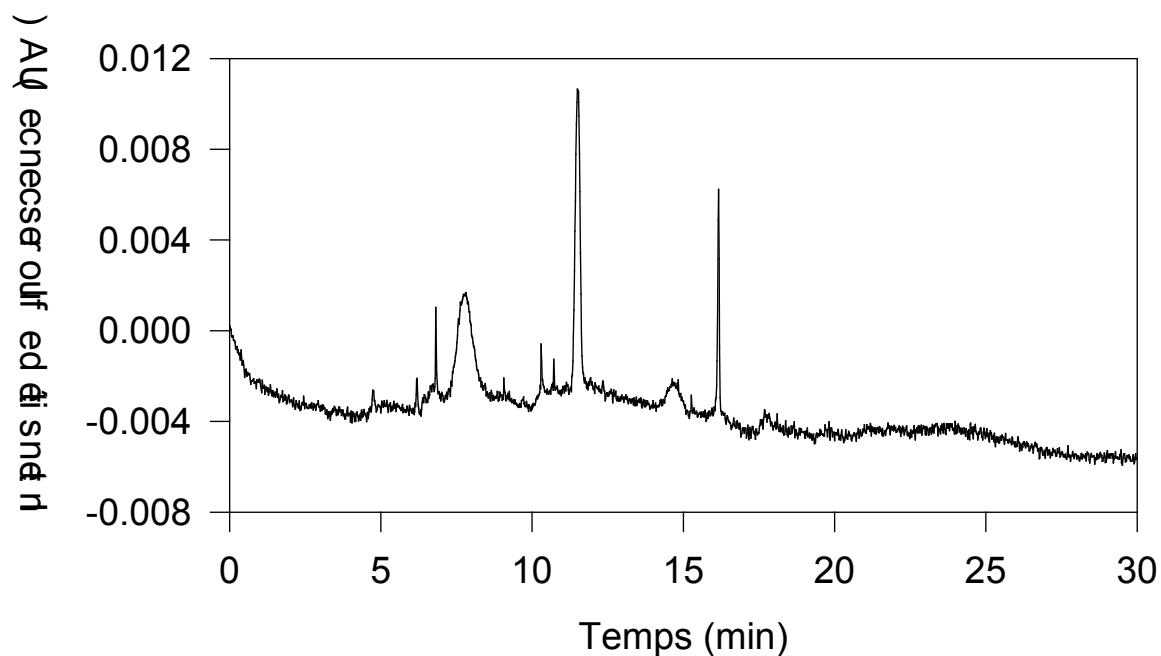


Figure V-10 : Electrophérogramme de 50 nM d'Oregon-IRE en présence de 2% de 2ME, 0.05 unité/ μ l d'inhibiteur de RNase et 25 nM de rhIRP1.
Injection : 5 secondes - Séparation : 20 KV - Capillaire nu.

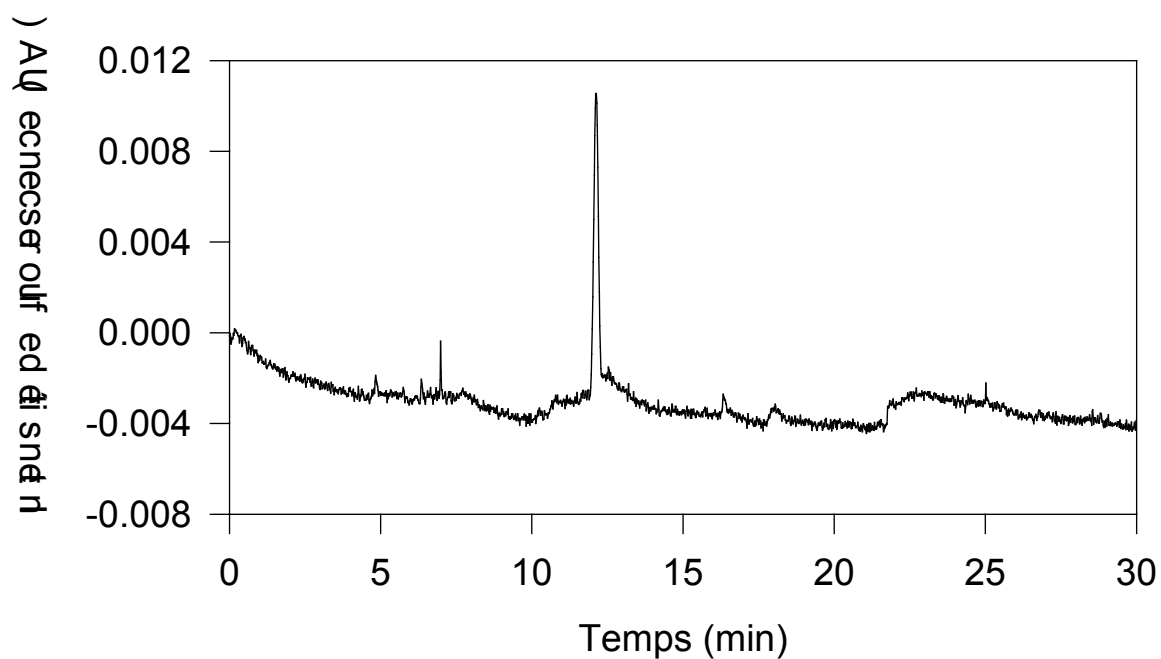


Figure V-11 : Electrophérogramme d'Oregon-IRE 50 nM en présence de 2% de 2ME, 0.05 unité/ μ l d'inhibiteur de RNase et 100 nM de rhIRP1.
Injection : 5 secondes - Séparation : 20 KV - Capillaire nu.

Les pics qui avaient été observés à des temps de rétention plus élevés (16.2 et 15 minutes) et attribués à la sonde libre ont complètement disparu, comme escompté dans le cas d'IRE totalement liée.

Néanmoins, le pic large précédemment observé à un temps de rétention de 8 minutes et proposé comme le complexe ARN/protéine n'est pas présent dans ces dernières conditions qui devraient permettre sa mise en évidence maximale. La nature de ce pic n'a donc pu être confirmée et le pic correspondant au complexe Oregon-IRE/IRP1 n'a pas pu être mis en évidence.

L'absence du pic correspondant au complexe ARN/protéine, important pour la mise en œuvre de la méthode, peut avoir plusieurs causes :

- La fluorescence du fluorophore lié à la sonde d'ARN, déjà affaiblie par cette liaison peut être totalement éteinte lors de la liaison de la protéine IRP à la sonde IRE modifiée.
- Le complexe ARN/protéine n'est pas efficacement élué du capillaire nu utilisé.

La première hypothèse nécessite une nouvelle stratégie de synthèse de la sonde IRE modifiée pour pouvoir espérer éviter ce phénomène éventuel.

Pour la seconde hypothèse, des essais de séparation par électrophorèse capillaire à l'aide de capillaires recouverts ont été réalisés. A la différence des capillaires nus, la paroi interne des capillaires neutres est recouverte d'une première couche masquant les groupes silanolates et d'une couche secondaire de polyacrylamide dont le rôle est de masquer les groupements hydrophobes portés par la première couche. Ceci permet de minimiser les interactions non spécifiques et dénaturantes qui pourraient exister entre différents solutés (ARN, protéine, complexe ARN/protéine) et le capillaire nu. Cette neutralisation a pour conséquence de diminuer la vitesse du flux électro-osmotique, par l'association d'un plus faible nombre de cations du tampon de séparation. C'est pourquoi, à longueur de capillaire égale à celle d'un capillaire nu, les séparations sur capillaire neutre ont été réalisées sur une plus grande période (80 minutes au lieu de 30).

Comme précédemment, 20 nM d'Oregon Green 488 cadaverin ont été injectés puis séparés. L'électrophérogramme obtenu est présenté en figure V-12. Il se caractérise par un pic unique à un temps de rétention de 36.6 minutes et correspond au fluorophore seul.

La sonde Oregon-IRE a été dénaturée 2 minutes à 85°C et mise en présence de 2% de 2ME et 0.05 unité/ μ l d'inhibiteur de RNase. Cette solution a été injectée et séparée, mais aucun pic de fluorescence, pouvant correspondre à l'Oregon-IRE n'a pu être observé (résultats non montrés).

Un essai en présence de protéine a néanmoins été réalisé pour le cas où le complexe IRE-IRP1 puisse être élué. Pour cela, la solution d'Oregon-IRE a été incubée avec la protéine rhIRP1 dans un rapport stœchiométrique de 1:2 (IRE:IRP1) et la solution injectée et séparée. Mais, comme sur les électrophérogrammes précédents, aucun pic n'a été observé sur les 60 minutes de séparation (résultats non montrés).

L'absence d'élution du capillaire neutre, qui doit pourtant minimiser l'interaction de la protéine et (ou) de l'ARN avec les parois du capillaire, ne permet pas d'apporter d'éclairage sur le défaut d'élution du complexe ARN/protéine, ou de la protéine du capillaire nu.

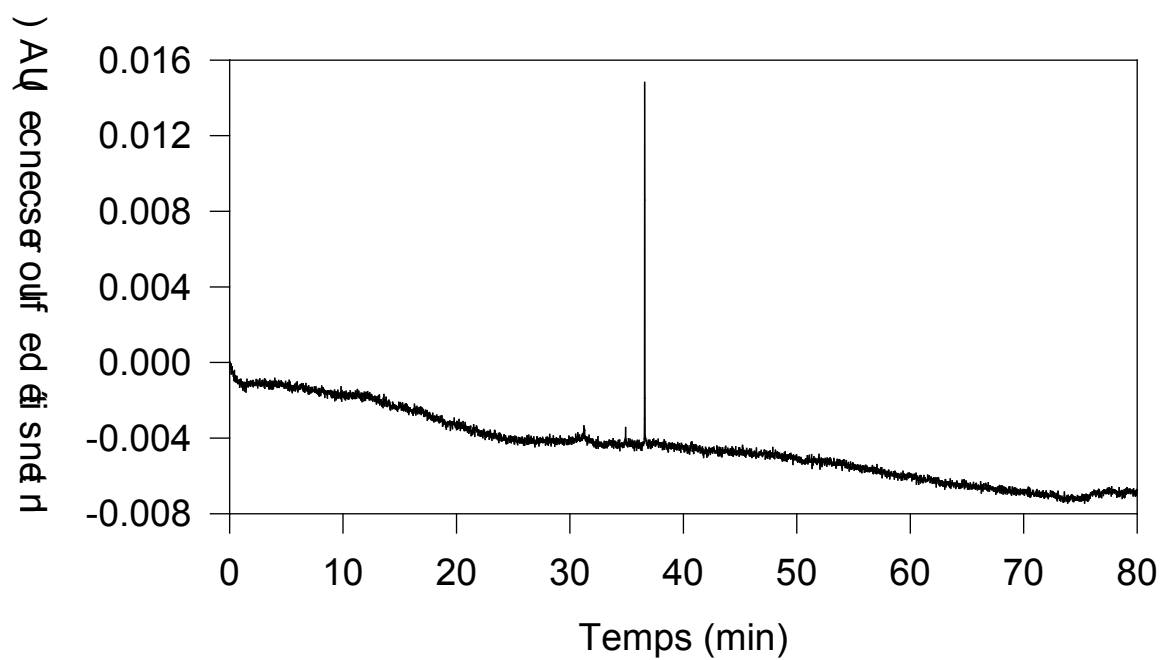


Figure V-12 : Electrophérogramme d'Oregon Green 488 cadaverin à 20 nM.

Injection : 10 secondes - Séparation : 30 KV - Capillaire neutre.

V-D Conclusion

Les expériences réalisées dans ce travail n'ont pas permis d'atteindre l'objectif souhaité, à savoir l'établissement d'une méthode alternative au retard sur gel d'électrophorèse, pour mesurer l'interaction entre les IRP et le motif IRE. Néanmoins, nos résultats permettent de discuter de la faisabilité de cette approche et d'offrir des perspectives d'amélioration.

Pour s'assurer de l'efficacité de cette méthode, il est indispensable de vérifier deux points critiques :

- La fluorescence semble être le mode de détection privilégié pour permettre une sensibilité suffisante. Dans un premier temps, il est donc nécessaire d'obtenir une sonde IRE marquée avec un fluorophore qui présente un fort rendement de fluorescence. De plus, il est indispensable que ce marquage n'empêche pas la formation en tige-boucle de l'IRE et n'empêche pas aussi la reconnaissance de la protéine IRP. Enfin, il est nécessaire de vérifier que la fluorescence n'est pas diminuée, soit au niveau du repliement de l'IRE, par des interactions avec les bases nucléiques, soit au niveau de l'interaction entre l'IRE et l'IRP. Pour cela, l'utilisation d'autres fluorophores, moins propices aux interactions avec les bases d'acides nucléiques en diminuant la taille du noyau polyaromatique par exemple, peut être envisagée. De plus, l'utilisation d'autres espaceurs que la cadavérine, sont aussi à prendre en considération. Ainsi, le greffage du fluorophore à une distance plus élevée de la structure en tige boucle ou la rigidification de l'espaceur peuvent éviter les interactions fluorophores/bases nucléiques qui semblent être la cause du phénomène de *quenching*.

- Dans un second temps, si un tel fragment d'ARN peut être obtenu, des conditions optimales de séparation du complexe ARN/protéine de l'IRE libre restent à déterminer afin de s'assurer d'une bonne élution des différents composés et une bonne reproductibilité. Pour cela, l'utilisation de différents tampons permettant la stabilisation du complexe ARN/protéine et une parfaite élution des capillaires sont à tester ; en effet, la nécessité de conserver des conditions non dénaturantes pour le complexe IRE-IRP peut constituer une limite à l'efficacité de

la séparation des IRE lié et complexé. L'utilisation de capillaires de différentes natures sont envisageables, notamment l'utilisation de capillaires remplis d'une matrice réticulée (gel) qui peuvent offrir un pouvoir résolutif plus élevé sur une longueur de capillaire moindre et donc un temps d'analyse diminué.

La mise au point d'une telle méthode permettrait le diagnostic rapide de l'état des IRP dans divers tissus ou cellules. L'un des avantages, outre la rapidité d'exécution, est que cette méthode serait exempte de l'utilisation de radioactivité. De plus, le dosage pourrait être en grande partie automatisé, facilitant d'autant plus son usage.

ETUDE STRUCTURALE DE LA PROTEINE rhIRP1

A ce jour, la structure tridimensionnelle d'une IRP n'a toujours pas été rapportée.

A défaut, la structure de l'aconitase mitochondriale (Robbins et Stout 1989) (Figure I-7) est utilisée comme modèle de IRP1 grâce à l'homologie existant entre les deux protéines (Figure I-6). Par modélisation, il s'avère que la majorité des insertions présentes dans la structure primaire de IRP1 peuvent se situer à la périphérie de la structure de la protéine mitochondriale.

Ce modèle est un pis-aller qui ne permet pas de décrire les changements structuraux associés aux changements d'activité d'IRP1 et, notamment, lors de la conversion de la forme aconitase dans la forme fixatrice du motif IRE.

En effet, de tels changements ont pu être mis en évidence par analyse de la différence de susceptibilité aux protéases entre la forme aconitase de IRP1 et la forme fixatrice du motif IRE. Cette dernière a toujours présenté plus de sites sensibles à diverses endo-peptidases que la forme enzymatique (Gegout *et coll.* 1999, Schalinske *et coll.* 1997, Swenson et Walden 1994).

De plus, l'IRE, dont la structure de l'exemplaire présent sur le messager de la chaîne H de la ferritine a été déterminée par résonance magnétique nucléaire (Address *et coll.* 1997), a toujours été modélisé au niveau d'une fissure où se situent l'essentiel des résidus nécessaires à la fixation de l'ARN (Paraskeva et Hentze 1996). A cause de l'encombrement stérique, la fixation du motif IRE suggère le déplacement relatif des quatre domaines de la protéine pour accommoder ce substrat.

Afin d'obtenir des renseignements structuraux plus précis sur la protéine IRP1, la disponibilité de grandes quantités de protéine recombinante pure a été mise à profit en utilisant des méthodes renseignant sur la structure en solution. Pour des protéines de la taille des IRP, la résolution atomique n'est envisageable que par cristallographie : des cristaux d'IRP1 de qualité suffisante pour une étude par diffraction des rayons X n'ayant pas encore été obtenus, il ne seront pas discutés. Néanmoins, d'autres techniques renseignant sur la

structure globale des macromolécules sont disponibles pour pouvoir comparer les deux formes actives d'IRP1.

VI-A Génération de la forme fixatrice du motif IRE de rhIRP1

Afin de comparer la forme aconitase de rhIRP1 à la forme fixatrice du motif IRE, il a fallu générer cette dernière à partir de la forme aconitase [4Fe-4S].

La forme démétaillée de IRP1 est généralement produite par un traitement avec un oxydant (Schalinske *et coll.* 1997). Lors de l'étude de l'effet du peroxyde d'hydrogène sur [4Fe-4S]-rhIRP1 (cf chapitre III-A-3), un fort excès de ce composé a démontré sa capacité à annihiler le signal RPE correspondant à la forme [3Fe-4S] de la protéine. Nous avons donc décidé d'utiliser cet oxydant pour générer la forme apoprotéine de IRP1 et pour cela la protéine sous sa forme aconitase a été traitée selon le protocole décrit dans le chapitre matériels et méthodes (VIII-E-4). D'autres tentatives de formation de la forme démétaillée de rhIRP1 ont été effectuées selon d'autres protocoles (utilisation de ferricyanure, modification du pH, ajout de chélateurs de fer, etc...), mais ceux-ci n'ayant pas apporté de résultats satisfaisants, il ne seront pas discutés.

En supplément du peroxyde d'hydrogène, la protéine [4Fe-4S]-rhIRP1 est incubée en présence d'EDTA pour chélater le fer libéré et éviter ainsi toute association de ce métal avec la protéine sur des sites alternatifs. La présence de DTT dans les tampons utilisés dans ces dernières étapes sert à maintenir un milieu suffisamment réducteur pour conserver les cystéines, nécessaires à la reconnaissance du motif IRE, dans leur état réduit.

Lors de l'incubation avec 0.2 M de peroxyde d'hydrogène et 10 mM d'EDTA, [4Fe-4S]-IRP1 a perdu sa couleur caractéristique de la présence du chromophore fer-soufre. La solution a été purifiée sur une résine d'Héparine-Sepharose et dessalée par filtration sur gel. Un aliquote de la solution finale a été testé pour son activité aconitase et comme attendu, celle-ci a totalement disparu (résultat non montré). L'activité de fixation au motif IRE de ce même aliquote a aussi été mesurée (Figure VI-1).

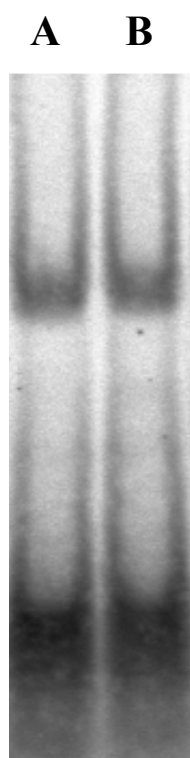


Figure VI-1 : Dosage de l'activité de fixation au motif IRE de 100 ng de rhIRP1, purifiée sur Héparine-Sepharose après traitement avec le peroxyde d'hydrogène et l'EDTA, en absence (puits A) et en présence (puits B) de 2% de 2ME.

La bande retardée du puits A, correspondant à 100 ng de protéine IRP1 suite au traitement par le peroxyde, est aussi intense que la bande du puits B correspondant à la même quantité de la même protéine en présence de 2% de 2ME.

L'IRP1 générée par ce traitement est donc totalement active pour la fixation du motif IRE et est utilisée pour les différentes études structurales comme représentant la forme fixatrice du motif IRE.

VI-B Etude par Diffusion de Neutrons

La diffusion des neutrons aux petits angles (Jacrot 1976) permet d'obtenir divers paramètres liés aux propriétés hydrodynamiques d'une protéine et donc à sa structure. Cette technique renseigne sur la taille des particules étudiées et sur l'organisation spatiale des divers domaines ou sous-unités d'une protéine ; il est même possible de proposer une représentation de l'enveloppe structurale à partir de données à des plus grands angles de diffusion (Byron et Gilbert 2000).

Contrairement à la diffraction, la diffusion des neutrons présente l'avantage de ne pas nécessiter la formation de cristaux de protéines. L'étude s'effectue donc sur des protéines en solution mais elle est très sensible à tout changement de taille des particules, y compris au phénomène d'agrégation. C'est pourquoi il est très important de s'assurer de la monodispersité des échantillons étudiés.

VI-B-1 Théorie de la diffusion des neutrons

Le faisceau de neutrons incident interagit avec les noyaux des particules en solution. Il est diffusé dans toutes les directions et chaque direction est caractérisée par un vecteur de diffusion Q qui, par rapport à la trajectoire initiale, correspond à une direction de diffusion d'un angle de 2θ (Figure VI-2).

L'intensité du rayonnement neutronique diffusé, $I(Q)$, qui est la grandeur physique mesurée par un détecteur placé derrière l'échantillon, est proportionnelle à un facteur nommé longueur de diffusion (b_i) qui est caractéristique de la nature du noyau diffusant (Tableau VI-1).

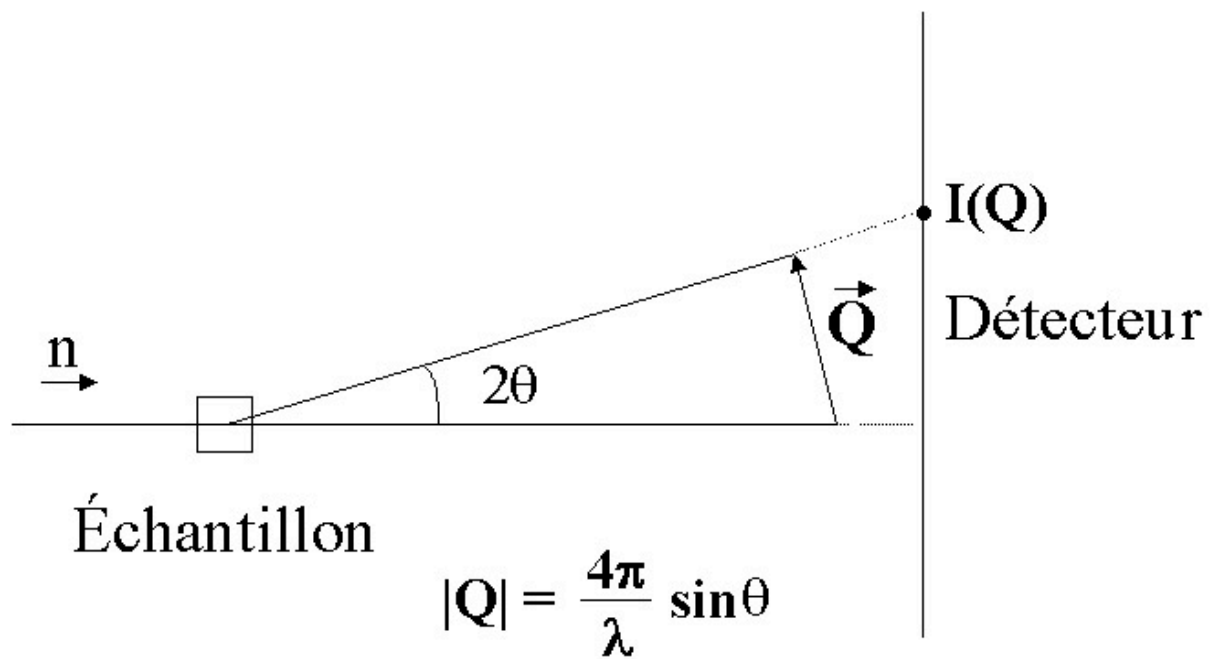


Figure VI-2 : Schéma représentatif de l'expérience de diffusion des neutrons.

$I(Q)$ est l'intensité mesurée et Q le vecteur caractérisant le faisceau diffusé.

Atome	Noyau	b_i (10^{-12} cm)
Hydrogène	^1H	-0.3742
Deutérium	^2H	0.6671
Carbone	^{12}C	0.6651
Azote	^{14}N	0.9400
Oxygène	^{16}O	0.5804

Tableau VI-1 : Longueurs de diffusion (b_i) des principaux atomes rencontrés dans les matières biologiques (Jacrot 1976).

Mathématiquement, l'intensité diffusée en un point correspondant à un vecteur de diffusion Q s'exprime :

$$I(Q) = \langle |\int_V [\rho(r) - \rho(s)] \exp(iQ \cdot r) d^3r|^2 \rangle \quad \text{Equation VI-1}$$

Où, $\rho(s)$ est la densité de diffusion du solvant et $\rho(r)$ la densité de diffusion d'un petit volume r . La notion de densité de diffusion correspond à l'intégrale, sur le volume, de la somme des longueurs de diffusion des atomes contenus dans ce volume (Equation VI-2).

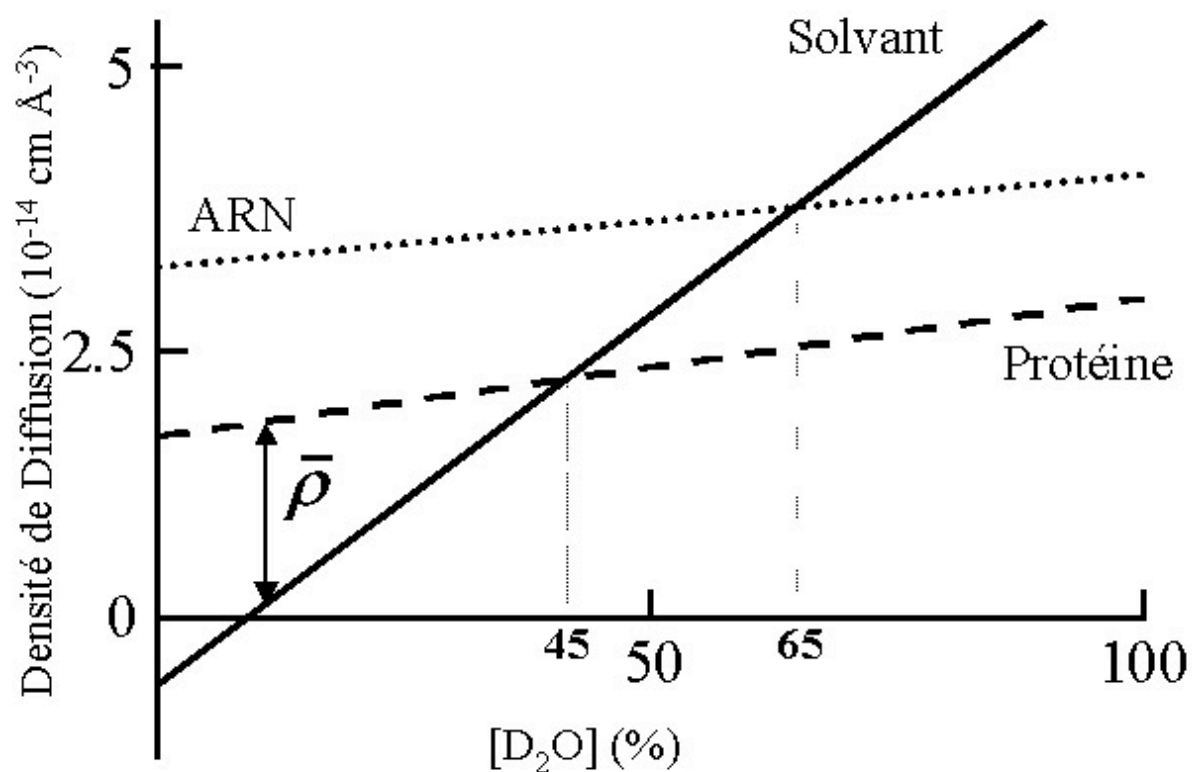
$$\rho(r) = 1/v \int_V b_i(r) d^3r \quad \text{Equation VI-2}$$

Cette densité de diffusion rend ainsi compte de la nature (longueur de diffusion, b_i) et la position (r) de l'ensemble des noyaux de la particule diffusante et donc de sa structure.

Les valeurs de longueur de diffusion (b_i) et donc les densités de diffusion résultantes, déterminent l'intensité diffusée. Contrairement à la diffusion des rayons X, dans laquelle l'interaction rayonnement-échantillon s'effectue avec les électrons, les neutrons interagissent avec les noyaux, qui présentent de grandes différences de longueur de diffusion y compris pour des atomes proches (Tableaux VI-1). Par exemple, la valeur de la longueur de diffusion du noyau d'hydrogène est négative, ce qui traduit la diffusion du faisceau résultant avec une opposition de phase par rapport au faisceau incident, alors que celle du deutérium est positive.

Cette caractéristique est à la base de la méthode de variation de contraste ; le contraste étant la différence entre la densité de diffusion de l'objet observé et la densité de diffusion du solvant utilisé : $\rho(r) - \rho(s)$ (Figure VI-3).

Cette méthode consiste à modifier la densité de diffusion du solvant en faisant varier sa proportion d'eau lourde. Les différents composants biologiques ne présentent pas une capacité d'échange de leur atomes d'hydrogène par les atomes de deutérium identique au solvant, majoritairement de l'eau. La densité de diffusion de l'échantillon varie avec la proportion d'eau lourde dans le solvant mais avec une dépendance différente du solvant. En conséquence, les droites représentant les densités de diffusion respectives des différents composants biologiques et du solvant se coupent en certains points nommés points



$\bar{\rho}$ = contraste

Figure VI-3 : Evolution de la densité de diffusion en fonction de la concentration d'eau lourde de quelques composants biologiques (Jacrot 1976).

isopicniques. Pour ces proportions de D₂O, la valeur du contraste et donc de l'intensité diffusée, sont nulles. Cette caractéristique est très intéressante dans le cas de l'étude de complexes ADN/Protéine, ADN/Lipide, Lipide/Protéine, puisqu'elle permet de s'affranchir de l'un des composants pour n'étudier que l'autre en se plaçant au niveau de ces points particuliers (Figure VI-4).

L'équation de l'intensité diffusée (Equation VI-1) peut se simplifier dans certaines conditions. Aux petits angles de diffusion, c'est à dire lorsque Q est petit, le développement limité de la fonction I(Q) a pour expression:

$$I(Q) = I(0) \exp [-(Rg^2Q^2)/3] \quad \text{Equation VI-3}$$

Cette expression, appelée équation de Guinier, fait intervenir le paramètre "Rg" nommé rayon de giration de la molécule diffusante. Ce paramètre est lié aux propriétés hydrodynamiques de la molécule en solution (forme, répartition de densité, etc...). Si la particule diffusante est monodisperse, la représentation des données obtenues aux faibles angles sous la forme $\log I(Q) = f(Q^2)$ suit une droite de pente $(- Rg^2/3)$. L'extrapolation de cette droite donne I(0) qui correspond à la diffusion à un angle nul et qui est proportionnelle à la masse moléculaire de la particule diffusante (Zaccaï & Jacrot 1983).

Les données acquises à de plus grands angles ne peuvent être simplifiées de la même façon, mais elles décrivent aussi la structure de la molécule diffusante. C'est grâce à l'acquisition de ce type de données qu'il est possible de reconstituer une enveloppe structurale de la protéine (Svergun 1999).

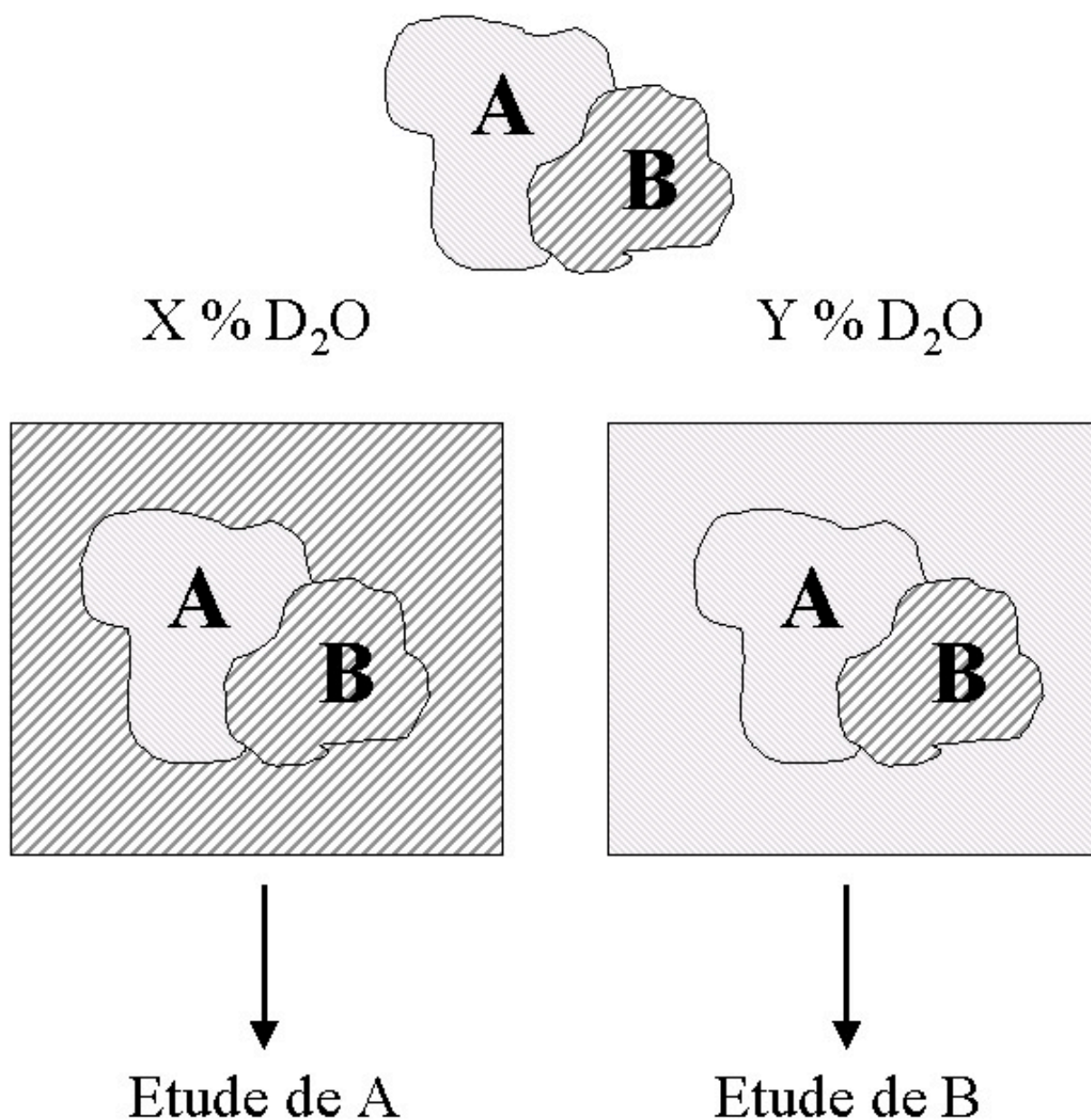


Figure VI-4 : Représentation schématique de l'étude par variation de contraste.

En se plaçant au point isopicnique du composé B ($X\%$ de D_2O), l'étude du seul composé A est possible. Inversement, en se plaçant au point isopicnique du composé A ($Y\%$ de D_2O), l'étude du seul composé B est possible.

VI-B-2 Résultats

Les échantillons des différentes formes de la protéine rhIRP1 (aconitase et fixatrice du motif IRE) à différentes concentrations de D₂O ont été préparés selon le protocole décrit au chapitre VIII-I-1

VI-B-2-a Forme aconitase de rhIRP1

Les valeurs de diffusion de la forme aconitase telle qu'isolée, représentées sous la forme $\log I(Q) = f(Q^2)$ (Figure VI-5), s'alignent sauf aux très faibles valeurs de Q^2 . La pente de cette droite permet de déterminer un rayon de giration pour la forme [4Fe-4S] de la protéine à 0% de D₂O de 32.0 Å.

Avec 65% de D₂O, correspondant au point isopicnique de l'ARN, (résultats non montrés), les données acquises sur [4Fe-4S]-rhIRP1 permettent de calculer un rayon de giration de 30.6 Å.

Enfin, la solution à 100% de D₂O a été étudiée, afin de maximiser le signal et de faire varier le contraste. Les mesures effectuées sur rhIRP1 dans ce tampon à 100% de D₂O, ont permis d'obtenir des données qui suivent une droite (Figure VI-5). De celle-ci un rayon de giration de 28.7 Å a été déduit pour la protéine.

On observe qu'avec l'augmentation de la concentration de D₂O, le rayon de giration mesuré pour la protéine diminue légèrement, passant de 32.0 Å à 0% de D₂O, puis à 30.6 Å à 65% de D₂O, pour finir à 28.7 Å à 100% de D₂O. Ce phénomène s'explique par l'hétérogénéité de l'échange H/D des résidus de la protéine. L'échange est à peu près complet pour les protons échangeables en surface et dans les premières couches de solvation, mais certains protons s'échangent très lentement à l'intérieur de la structure. Ainsi, la surface apparente de la protéine semble varier et le rayon de giration mesuré de la molécule diffusante diminue proportionnellement à la concentration d'eau lourde dans le solvant.

Des données de diffusion de la forme aconitase de rhIRP1 à 65% de D₂O ont été acquises à de plus grandes valeurs de Q , traitées avec le logiciel GNOM (Svergun *et coll.* 1998), et représentées sous la forme $P(R)$ correspondant à la distribution des longueurs entre

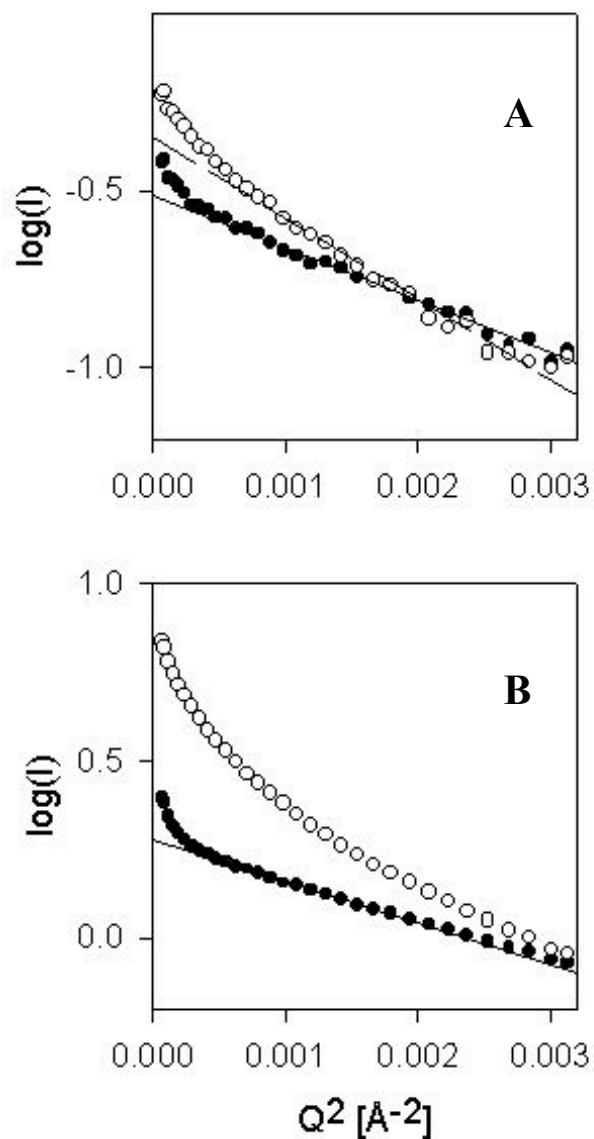


Figure VI-5 : Représentation de Guinier des données de diffusion des neutrons des différentes formes de rhIRP1 aux petits angles.

Température : 20°C; Distance échantillon-détecteur : 4 m; Longueur d'onde : 1 nm.
Ronds noirs : [4Fe-4S]-rhIRP1; Ronds blancs : forme fixatrice du motif IRE de rhIRP1.
A : Données à 0% D_2O ; B : Données à 100% D_2O .

deux éléments diffusant d'une même particule (Figure VI-6). Ces données ont été comparées à celles obtenues à partir d'une simulation basée sur la structure tridimensionnelle de l'aconitase mitochondriale (Figure VI-6) à l'aide du logiciel CRY SOL (Svergun *et coll.* 1995).

Les données expérimentales sur la protéine cytosolique suivent une courbe en cloche, relativement symétrique, et assez semblable à la courbe déduite de l'aconitase mitochondriale, démontrant une particule compacte et globulaire. La courbe atteint un maximum légèrement inférieur à 40 Å, mais supérieur à celui de l'aconitase mitochondriale. Cette contribution aux plus grandes valeurs de R est aussi observée entre 45 et 65 Å. Au delà, la contribution de la protéine rhIRP1 est plus certainement due au léger phénomène d'agrégation précédemment observé (Figure VI-5).

Cette contribution aux plus grandes distances est en accord avec le fait que la protéine rhIRP1 est plus grosse que l'aconitase mitochondriale (+18%). Un rayon de giration de 25.6 Å pour cette dernière a pu être calculé, à partir de la simulation, et il est plus petit que celui déterminé pour la forme aconitase de rhIRP1 (30.6 Å à 65% de D₂O), en accord avec le fait que cette dernière est plus grande.

VI-B-2-b Forme fixatrice du motif IRE de rhIRP1

Une étude similaire aux faibles valeurs de Q a été réalisée avec les échantillons de la forme fixatrice du motif IRE de rhIRP1.

A 0% de D₂O, les données obtenues représentées sous la forme $\log(Q) = f(Q^2)$ ont pu être raisonnablement alignées, malgré le fait que les points aux faibles valeurs de Q^2 dévient de cette droite (Figure VI-5). La pente a permis de déduire un rayon de giration égal à 39.7 Å pour cette forme de la protéine.

A 65% (résultats non montrés) et 100% (Figure VI-5) de D₂O, les données mesurées pour la forme de rhIRP1 fixatrice du motif IRE ne peuvent être alignées sur une droite et aucune valeur du rayon de giration n'a pu être déterminée à cause d'un phénomène d'agrégation de la protéine.

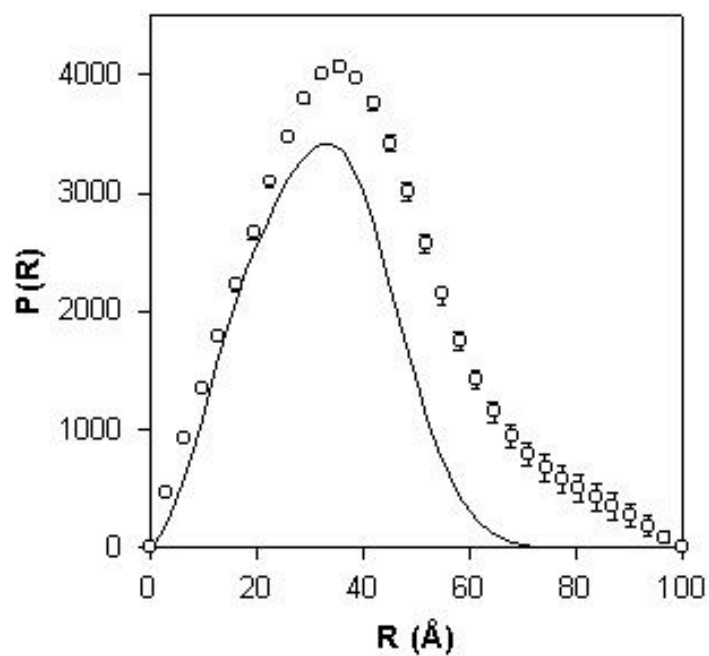


Figure VI-6 : Représentation de la fonction $P(R)$ de l'aconitase mitochondriale (trait plein) et des données de diffusions de la forme [4Fe-4S]-rhIRP1 à 65% de D_2O (points blancs).

Température 20°C, Distance échantillon-détecteur : 2 m, Longueur d'onde : 0.5 nm.

VI-B-2-c Forme fixant le motif IRE de rhIRP1

La forme capable de fixer le motif en tige boucle d'ARN a été étudiée en ajoutant à la solution de protéine une solution d'IRE dans un rapport stœchiométrique final de 1:1, afin de juger des changements structuraux qui peuvent intervenir lors de la liaison du substrat.

Les données de diffusion des neutrons aux petits angles obtenues pour ce mélange en eau légère s'alignent (résultats non montrés), mais aucune valeur de rayon de giration n'a été calculée. En effet, dans ces conditions, les contributions des constituants du mélange sont différentes (Figure VI-3). Et comme l'intensité diffusée dépend du contraste, différent pour l'ARN et la protéine, ceci invalide la signification de la valeur de rayon de giration du complexe calculée dans l'approximation de Guinier.

Le mélange entre IRE et rhIRP1 sous sa forme fixant l'ARN [1:1] avec 65% de D₂O a été étudiée. Les données obtenues s'alignent (Figure VI-7). Etant donné qu'à 65% de D₂O la valeur de contraste pour l'ARN est nulle (point isopinique), l'intensité diffusée ne dépend donc que du facteur protéique du mélange IRE/rhIRP1 et une valeur du rayon de giration de cette forme de la protéine a pu être déterminée à 35.1 Å.

Le mélange à 0% de D₂O, bien que ne pouvant pas nous renseigner sur le rayon de giration de la protéine, présente des données qui démontrent que la protéine n'est pas agrégée, comme précédemment observé sur la forme aconitase et sur la forme fixatrice du motif IRE.

A 65% de D₂O, la diffusion des neutrons du mélange, en n'étant due qu'à la contribution de la protéine, permet d'obtenir une valeur significative du rayon de giration. Ceci est différent de ce qui a pu être observé précédemment sur la forme fixant l'IRE à 65% de D₂O où, en l'absence d'ARN, la protéine présente quelques signes d'agrégation. Ainsi la présence de substrat dans le mélange maintient rhIRP1 en solution dans ces conditions.

Néanmoins, à 100% d'eau lourde et malgré la présence de substrat, ce dernier ne permet pas d'apporter une stabilisation suffisante de la protéine qui a tendance à s'agréger.

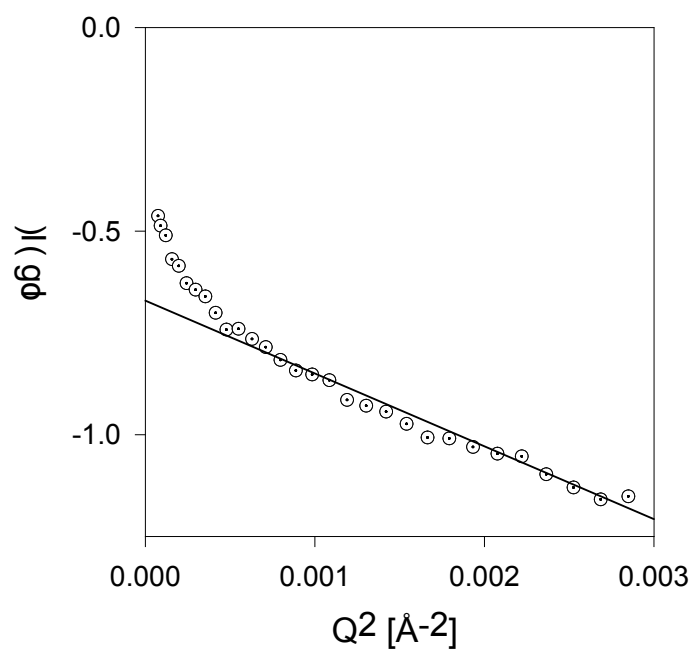


Figure VI-7 : Représentation de Guinier des données de diffusion des neutrons aux petits angles de la protéine rhIRP1 fixant l'IRE.

Température : 20°C; Distance échantillon-détecteur : 4 m; Longueur d'onde : 1 nm.

VI-C Etude par Dichroïsme Circulaire

Une seconde méthode d'analyse de la structure des protéines a été utilisée pour l'étude de la protéine rhIRP1 sous ses deux formes actives : aconitase et fixatrice du motif IRE.

Cette méthode, le dichroïsme circulaire (CD), permet d'obtenir des renseignements sur la structure secondaire des protéines et d'autres molécules biologiques en solution en utilisant de faibles quantités de matériel.

VI-C-1 Théorie

D'un point de vue méthodologique, lorsqu'un composé chiral interagit avec la lumière circulairement polarisée, il absorbe différemment les composantes droite et gauche (Equation VI-4).

$$\Delta A = (A_D - A_G) \quad \text{Equation VI-4}$$

Les acides aminés, excepté la glycine, étant tous chiraux et existant sous leur énantiomère L dans les protéines, ces macromolécules présentent un signal de dichroïsme circulaire. Les éléments de structure secondaire organisent les acides aminés de façon caractéristique, ce qui leur confère une signature CD propre (Figure VI-8). La majorité du signal des protéines dans l'ultra-violet provient de leurs éléments de structures secondaires et est liée à leur proportion.

Cette technique est utilisée pour l'étude du repliement des protéines (Kelly et Price 1997), mais permet aussi de quantifier les éléments de structure secondaire contenus dans une protéine (Greenfield 1997).

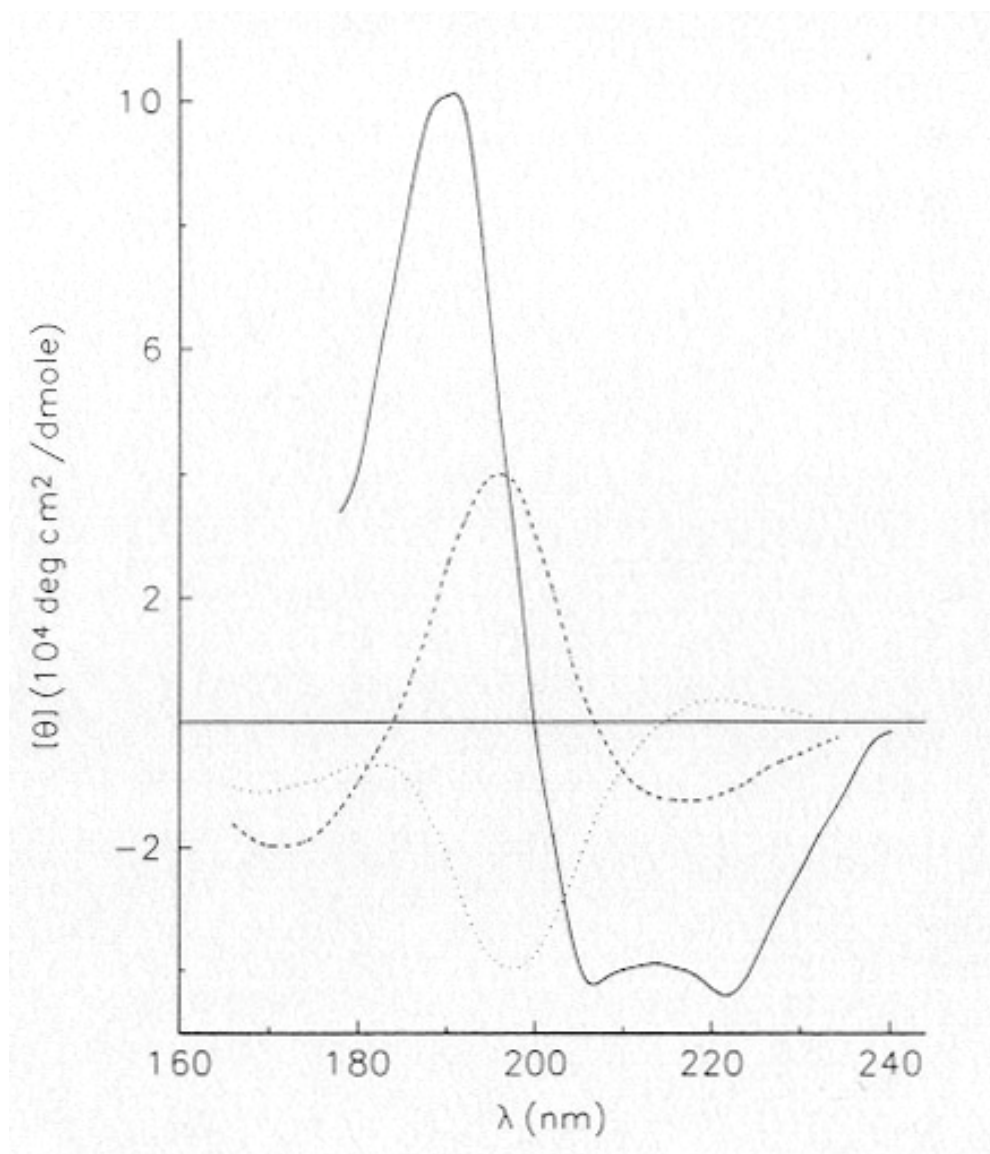


Figure VI-8 : Spectres CD de différents éléments de structures secondaires.

Trait plein : hélice α , Pointillés gras : feuillet β , Pointillés : désordonné (Woody 1995).

VI-C-2 Résultats

Les échantillons protéiques à analyser ont été dessalés sur une résine de polyacrylamide (Biogel P6) équilibrée en tampon 10 mM de phosphate de potassium (KPi) pH 7.4, afin d'éliminer le tampon Tris qui présente un signal de dichroïsme circulaire dans l'UV lointain.

VI-C-2-a Forme aconitase de IRP1

Le spectre CD de 1 μ M de rhIRP1 sous sa forme aconitase dans 10 mM KPi pH 7.4 a été mesuré dans une cuve en quartz de 1 mm de chemin optique. Au spectre obtenu a été soustrait le spectre du tampon seul enregistré dans des conditions identiques, afin de ne présenter que la contribution de la protéine (Figure VI-9-A).

Le spectre de [4Fe-4S]-rhIRP1 présente un maximum dextrogyre vers 195 nm et deux maxima lévogyre vers 210 nm et 220 nm, en accord avec un mélange d'éléments de structures secondaires (α/β) (Venjaminov et Yang 1996). Au dessus de 260 nm, le signal CD est très faible.

La possible contribution de l'agrégat fer-soufre de cette forme de la protéine au spectre CD a été vérifié en étudiant la ferrédoxine 2[4Fe-4S] de *Clostridium pasterianum*. Cette petite protéine ne contenant que très peu de structure secondaire (Dauter *et coll.* 1997), elle doit présenter un signal CD minimal. Un spectre CD de 0.5 μ M de cette ferrédoxine, pour égaliser la quantité de d'agrégat [4Fe-4S], a été enregistré (résultats non montrés). Le spectre obtenu ne présente pas de signal à des longueurs d'onde supérieures à 230 nm, où le signal du centre fer-soufre est attendu. En dessous de 230 nm, seules de faibles bandes, positive à 215 nm et négative à 195 nm, sont observées et d'une intensité bien plus faible que la contribution de [4Fe-4S]-rhIRP1 dans ces régions. Ces faibles bandes pouvant provenir aussi bien des agrégats fer-soufre de la protéine que du peptide de la ferrédoxine, la contribution de l'agrégat [4Fe-4S] au spectre CD de la forme aconitase de rhIRP a été considéré comme négligeable et aucune correction supplémentaire n'a été apportée.

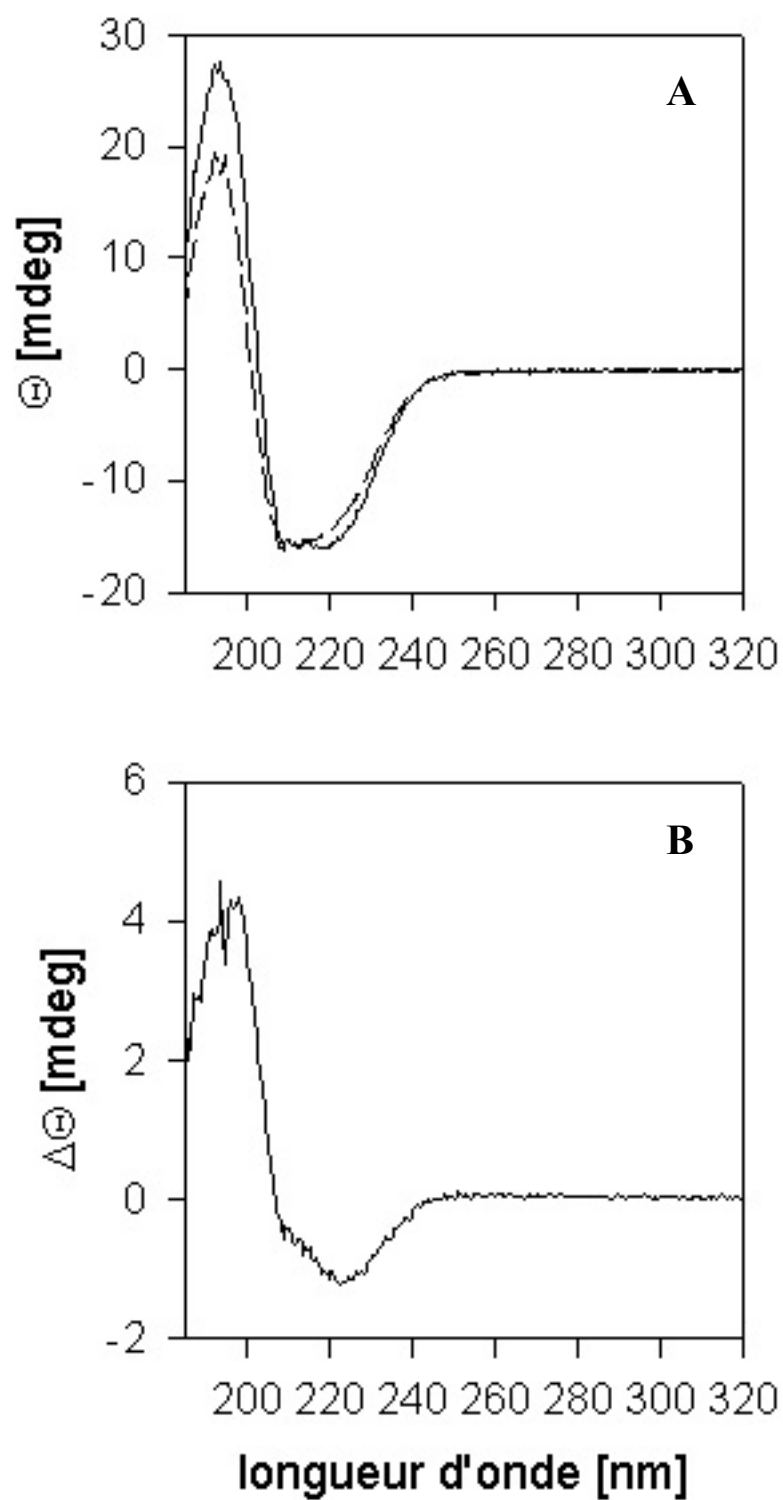


Figure VI-9 : Spectres CD de rhIRP1

A : Spectres CD de 1 μ M de [4Fe-4S]-rhIRP1 (trait plein)
et 1 μ M de la forme fixatrice d'IRE (pointillés)

B : Spectre CD de différence entre la forme [4Fe-4S] et la forme fixatrice d'IRE de rhIRP1.

VI-C-2-b Forme fixatrice du motif IRE

Dans des conditions similaires, le spectre CD de 1 μ M de rhIRP1 sous sa forme fixatrice d'IRE dans 10 mM KPi pH 7.4 été enregistré dans une cuve en quartz de 1 mm de chemin optique (Figure VI-9-A).

Le spectre corrigé de la contribution du tampon entre 185 et 320 nm se présente d'une manière assez similaire à celui de la forme aconitase de la protéine, avec un maximum positif à 195 nm et un maximum négatif aux alentours de 210 nm.

VI-C-2-c Comparaison de la forme aconitase et de la forme fixatrice du motif IRE de rhIRP1

Néanmoins, bien que les spectres CD des formes aconitase et fixatrice du motif IRE de rhIRP1 soit assez semblables, une différence est quand même notable et plus facilement analysable sur le spectre de différence présenté en figure VI-9-B. Ce spectre CD de différence, correspondant au spectre CD de [4Fe-4S]-rhIRP moins le spectre CD de la forme capable de fixer le motif IRE de la même protéine, présente un maximum positif à 195 nm et un maximum négatif à 222 nm, ainsi qu'un épaulement vers 210 nm.

Ceci indique que des éléments de structure secondaire sont perdus lors du démantèlement de l'agrégat fer-soufre. Les hélices- α montrent un signal intense avec des maxima vers 195 nm (positif) et 220 (négatif) nm (Figure VI-8), mais d'autres éléments, comme les feuillets- β , peuvent aussi contribuer à ce spectre.

VI-C-2-d Etude de la fixation du motif IRE

Ainsi le passage de la forme aconitase à la forme capable de lier l'ARN s'accompagne d'une perte d'éléments de structure secondaire. La fixation du motif IRE sur la protéine a été étudiée en analysant les spectres de dichroïsme circulaire du mélange de la forme de la protéine IRP1 capable de fixer l'ARN et du motif IRE.

VI-C-2-d-i Motif IRE

Le spectre CD de 1 μ M d'IRE, préalablement dénaturé 2 minutes à 85°C, a été enregistré dans 10 mM KPi pH 7.4 (Figure VI-10-A). Une bande positive à 270 nm et une bande négative à 210 nm, typiques des acides nucléiques (Tinoco *et coll.* 1980) sont observables, mais d'une intensité plus faible que le signal observé avec la protéine à concentration molaire égale.

VI-C-2-d-ii Forme de rhIRP1 fixant le motif IRE

A cette solution d'IRE, la protéine rhIRP1 sous sa forme capable de fixer le motif IRE a été ajoutée à une stœchiométrie de 1:1 et le spectre CD enregistré (Figure VI-10-A). Celui-ci correspond dans son allure générale à la somme du spectre CD de la protéine sous sa forme capable de fixer le motif IRE et du spectre de l'IRE précédemment observé. Néanmoins, si le spectre expérimental de l'IRE est ajouté à celui de la forme capable de fixer l'IRE de rhIRP1, de subtiles différences sont observables avec le spectre CD du mélange et, notamment, une plus forte contribution de ce dernier à 222 nm, plus facilement observable sur le spectre de différence (Figure VI-10-B).

Initialement, des problèmes de reproductibilité ont été rencontrés lors de l'étude de ces légers changements de spectre CD.

Le mélange rhIRP1: IRE (1:3) fait à température ambiante donne un spectre présenté en figure VI-11-A. Quand ce mélange est incubé durant 15 minutes à 37°C (Figure VI-11-A), le spectre CD évolue, comme visualisé sur le spectre de différence (Figure VI-11-B). Celui-ci se caractérise par une bande négative vers 222 nm et une légère bande positive vers 195 nm. Ainsi l'incubation des composants à 37°C a permis de confirmer l'observation précédemment effectuée sur le mélange stœchiométrique (Figure VI-10), à savoir le développement d'éléments de structure secondaire lors de la fixation d'IRE sur IRP1. De plus, le spectre de différence présente aussi une bande négative à 270 nm, correspondant à la contribution du motif IRE. Cette diminution d'intensité de cette bande montre ainsi que la contribution spectrale de l'IRE change lors de sa fixation sur rhIRP1. Au dessous de 210 nm la différence de CD peut s'expliquer à la fois par un changement de conformation de l'IRE mais aussi de la protéine rhIRP1 qui contribue beaucoup plus à ces longueurs d'ondes.

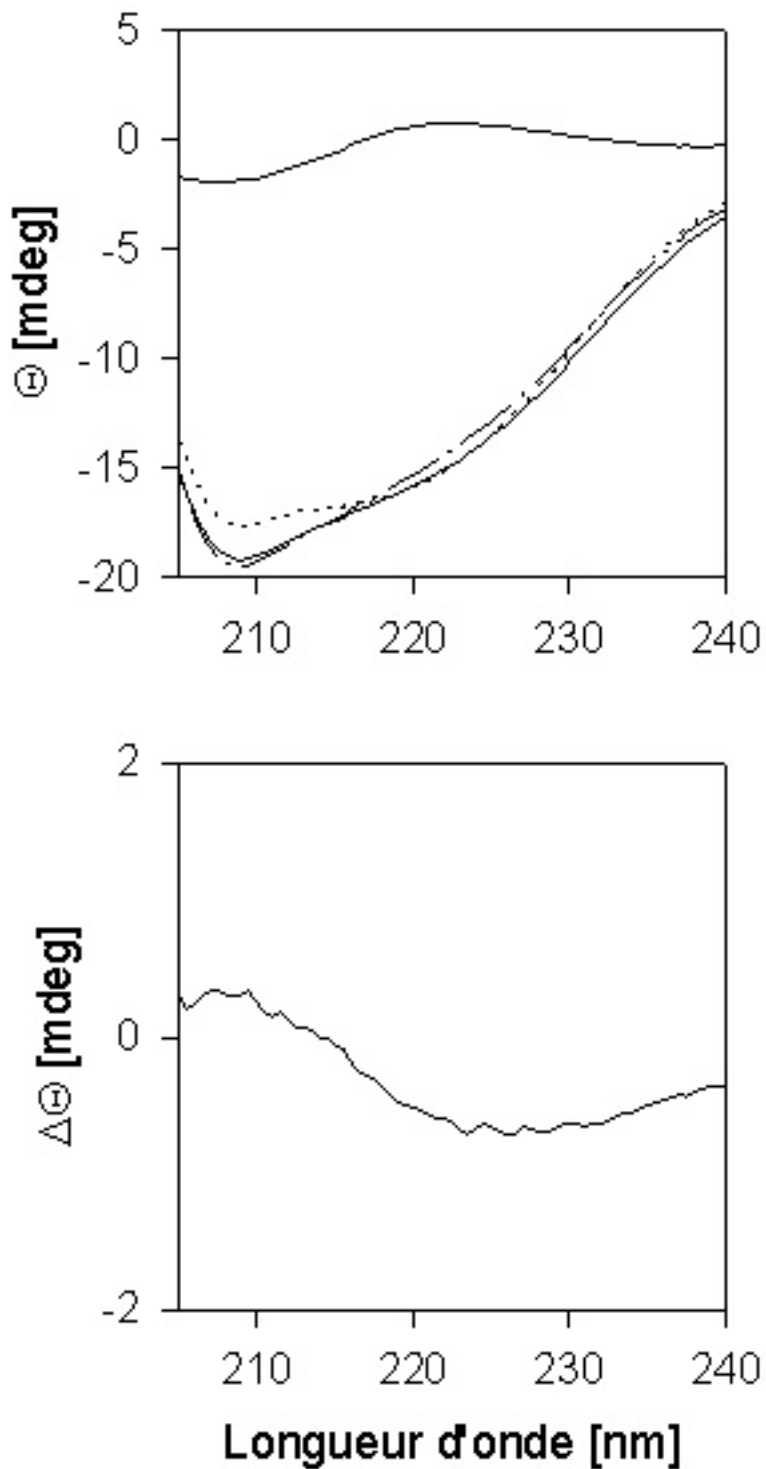


Figure VI-10 : Spectre CD de rhIRP1 fixant le motif IRE.

A : IRE (trait plein de faible intensité); forme fixatrice d'IRE de rhIRP1 (pointillés), complexe rhIRP1/IRE [1:1] (train plein), somme algébrique des deux premiers spectres (trait - point).

B : Spectre de différence entre le spectre CD du mélange rhIRP1:IRE [1:1] et celui de la somme algébrique des deux composants.

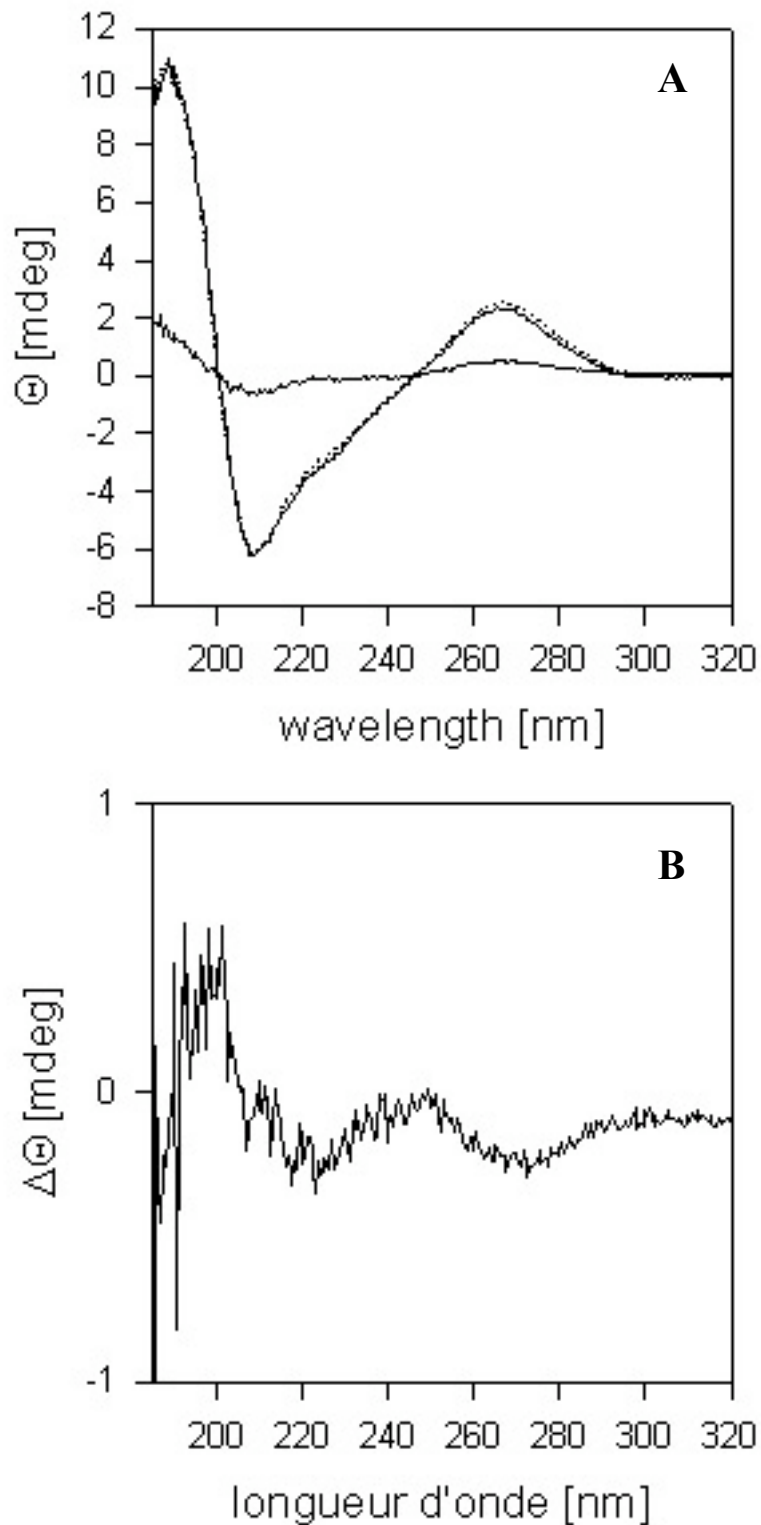


Figure VI-11 : Evolution du spectre CD lors de la fixation de rhIRP1 au motif IRE.

A : 0.5 μ M IRE (train plein, faible intensité), 0.5 μ M rhIRP1 fixatrice d'IRE + 1.5 μ M IRE avant (pointillés) et après (trait plein) incubation à 37°C.

B: Spectre de différence entre les deux derniers spectres.

VI-D Discussion

La comparaison de l'ensemble des données issues de l'étude de diffusion des neutrons, résumées dans le tableau VI-2, montre que, malgré la tendance à l'agrégation de la forme fixatrice du motif IRE en présence d'eau lourde, les rayons de giration mesurés sur les deux formes de la protéine sont systématiquement différents. La forme aconitase, [4Fe-4S], de la protéine rhIRP1 présente un rayon de giration plus faible que celui de la forme fixatrice d'IRE. Cette différence de rayon de giration systématique peut s'expliquer par un agencement plus compact de la forme aconitase de la protéine IRP1 par rapport à sa forme démétaillée, fixatrice du motif IRE. Cette forme plus compacte de la protéine IRP1 sous la forme aconitase est en accord avec sa plus faible susceptibilité aux endo-protéases (Gegout *et coll.* 1999, Schalinske *et coll.* 1997, Swenson et Walden 1994).

De plus, la comparaison des spectres CD de ces mêmes formes de la protéine rhIRP1 montre que, bien que ces formes soient relativement semblables, et compatibles avec une structure α/β , une perte d'une petite partie de ces éléments de structure se produit lors du démantèlement de l'agrégat fer-soufre.

Ainsi, grâce à deux techniques structurales, une différence entre les deux formes de la protéine rhIRP1 a pu être observée. Par analogie avec l'aconitase mitochondriale (Figure I-7), la structure de l'aconitase cytosolique ([4Fe-4S]-IRP1) est sensée s'organiser en 4 domaines globulaires, où les domaines I-III sont liés au domaine IV via un peptide peu structuré. L'agrégat fer-soufre, outre son rôle catalytique dans la réaction de transformation du citrate en *iso*-citrate, joue aussi un rôle structural en liant divers résidus du domaine I-III, notamment les cystéines ligands de l'agrégat, ou certains résidus entrant en interaction avec le centre fer-soufre ou le(s) substrat(s) par des liaisons hydrogènes et des interactions électrostatiques. Ainsi la perte de l'agrégat entraîne une déstabilisation de la structure de la protéine, qui peut se traduire par une réorganisation d'au moins un des quatre domaines de la protéine et une certaine "ouverture" de celle-ci, traduite par l'augmentation du rayon de giration de la molécule, mais aussi par la perte d'éléments de structure secondaire.

Concentration D₂O	[4Fe4S]-rhIRP1	Apo-rhIRP1	Apo-rhIRP1 + IRE [1:1]
0%	32.0	39.7	nc
65%	30.6	ag	35.1
100%	28.6	ag	ag

Tableau VI-2 : Tableau récapitulatif des rayons de giration des différentes formes de rhIRP1 obtenus lors de l'étude de diffusion des neutrons aux petits angles.

ag : agrégé ; nc non calculé.

Lors de l'étude de diffusion des neutrons, l'interaction de la sonde IRE avec la forme capable de fixer le motif IRE de rhIRP1 provoque une légère stabilisation de la protéine, caractérisée par une plus faible tendance à l'agrégation. Ceci a permis de calculer un rayon de giration de 35.1 Å pour la forme fixant le motif IRE. En supposant que l'évolution du rayon de giration, avec la concentration d'eau lourde, est sensiblement la même pour la forme capable de fixer la sonde IRE que pour la forme aconitase de rhIRP1, le rayon de giration calculé pour la forme fixant l'ARN se situe entre la forme compacte aconitase et la forme capable de lier les IRE. Ainsi, le réarrangement structural d'IRP1 lors de la fixation d'IRE conduit à une plus grande compacité de la protéine.

Par dichroïsme circulaire, une modification de la proportion d'éléments de structure secondaire apparaît lors de la fixation du motif IRE par la protéine rhIRP1. Elle se traduit par un gain de CD négatif à 222 nm, ainsi qu'un gain de CD positif à 190 nm compatible avec la formation d'éléments de structure secondaire. De plus, cette modification de la structure de la protéine est associée à une modification de la structure de l'ARN comme en témoigne la différence d'intensité de CD à 270 nm.

Ainsi lors de la fixation de l'ARN, la protéine IRP1 semble se replier sur son substrat caractérisé par un rayon de giration compris entre celui de la forme démetallée et celui de la forme [4Fe-4S]. Ce gain de compacité s'accompagne d'un gain d'éléments de structure secondaire mais qui ne compense pas la perte observée lors du démantèlement de l'agrégat fer-soufre.

CONCLUSION GENERALE

L'ensemble des travaux effectués au cours de cette thèse permettent de tirer quelques conclusions générales.

Expression et purification de rhIRP1

Au sujet de la stratégie d'expression de la protéine IRP1 humaine, elle a été validée puisque le produit finalement purifié se présente majoritairement sous sa forme aconitase, démontrant que la synthèse de protéine à centre fer-soufre d'origine eucaryote est possible dans le système procaryote *Escherichia coli*. Aucun composant spécifique aux eucaryotes n'est nécessaire à la biosynthèse de la protéine ou de son centre fer-soufre.

La méthode de purification utilisée pour l'obtention de la protéine rhIRP1 pure n'est pas comparable aux méthodes précédemment décrites, qui permettent l'obtention rapide de la protéine, notamment grâce à l'utilisation d'interactions spécifiques. En effet, notre protocole demande près de trois semaines de travail pour l'obtention du produit final, mais celui-ci est isolé en grandes quantités et de façon homogène sous sa forme aconitase. Ce résultat ne semble pas avoir été atteint dans d'autres laboratoires. Cette forme aconitase est stable, plus que la forme capable de fixer le motif IRE dans nos conditions, qui a tendance à s'agréger lors de l'étude de diffusion des neutrons en présence d'eau lourde par exemple.

En pratique, les quantités d'IRP1 obtenues nous ont permis d'envisager de nombreuses études biochimiques et structurales, localement et en collaboration avec des laboratoires extérieurs.

Etude de la réactivité de IRP1

La réactivité des espèces dérivées de l'oxygène a été étudiée par des méthodes biochimiques et spectroscopiques complémentaires. La protéine [4Fe-4S]-rhIRP1, est sensible vis à vis de l'ion superoxyde, du peroxyde d'hydrogène ou de l'oxygène singulet, mais elle s'est montrée plus stable vis à vis de l'oxygène moléculaire et, notamment, plus stable que son homologue mitochondrial principalement isolé sous la forme [3Fe-4S], inactive.

Plus particulièrement, l'étude de la réactivité de la protéine rhIRP1 vis à vis du peroxyde d'hydrogène a permis de mettre en évidence la libération d'un atome de fer ferreux de l'agrégat [4Fe-4S] de la protéine et la stabilisation de l'intermédiaire inactif [3Fe-4S], associé à l'absence d'apparition de la forme capable de lier l'ARN. Cette réactivité s'oppose au phénomène d'activation de la protéine pour sa fixation au motif IRE observé sur les fibroblastes murins traités par le peroxyde d'hydrogène et conforte l'hypothèse d'une cascade de transduction du signal permettant l'activation des IRP. Nous pouvons noter que cette étude est la première à avoir mis en évidence la mobilisation de fer réduit à partir d'un centre fer-soufre dans des conditions de stress oxydant. Cette observation a été confirmée par d'autres, et il est probable que ce phénomène joue un rôle significatif *in vivo* dans la propagation de la situation de stress. Des expériences complémentaires aux nôtres sur la réactivité et les flux de fer *in vivo* en présence d'un excès modéré d'eau oxygénée devront valider cette proposition.

Les études menées sur les effets de la doxorubicine, en collaboration avec le Laboratoire de Biologie du Stress Oxydant / Faculté de Pharmacie de Grenoble, a permis de montrer que le système IRP était une cible potentielle de la drogue. Néanmoins, les mécanismes mis en jeu semblent être multiples, notamment avec une réactivité différente de la drogue sur les cellules et sur la protéine seule. L'implication d'espèces réactives de l'oxygène, générées par catalyse de la doxorubicine, dans les mécanismes de réactivité de la doxorubicine est une piste à étudier, mais aussi la possibilité d'une cascade de transduction du signal comme décrit pour le peroxyde d'hydrogène.

Enfin, la réactivité du 2ME utilisé en routine pour activer la protéine pour la fixation au motif IRE a été étudiée. Le caractère réducteur de la molécule est impliqué dans cet effet d'activation mais certainement à de faibles concentrations sur la forme démétaillée. L'action sur le démantèlement de l'agrégat fer-soufre semble plutôt être due à un effet chaotrope généré par les fortes concentrations de 2ME sur de faibles quantités d'IRP1, comme le montre l'effet similaire observé avec un solvant comparable: l'éthanol.

Actuellement, la poursuite de l'étude de la réactivité de la protéine rhIRP1 s'effectue en collaboration avec deux laboratoires parisiens (Institut de Chimie des Substances Biologiques, Gif/Yvette, France et CEA Saclay, France). Les effets de diverses espèces réactives de l'azote sont étudiés à la fois par l'étude des activités aconitase et de fixation à

l'IRE, mais aussi par spectrométrie de masse, associée à des méthodes spectroscopiques comme la résonance Raman ou la RPE.

Etude double hybride

Les études effectuées pour mettre en évidence l'existence de partenaires physiologiques et spécifiques de la protéine IRP1 par la méthode du double hybride se sont montrées infructueuses. Le fragment de protéine étudié a permis de révéler uniquement des interactions non spécifiques, mais surtout la construction utilisée pour l'étude de la protéine entière s'est montrée être un mauvais appât pour l'expérience double hybride. Néanmoins, nous pensons que, malgré cette absence de résultat, l'existence de partenaires physiologiques de la protéine IRP1 ne peut pas être remise en cause sur cette seule base. Notamment, de nombreuses indications, y compris certaines obtenues au cours de ce travail, montrent que la conversion entre les deux formes actives d'IRP1 *in vivo* n'est pas directement due à l'action des réactifs généralement utilisés, mais qu'elle fait intervenir des mécanismes de signalisation qui restent à définir. La possibilité d'étudier d'autres fragments spécifiques des IRP ou la protéine complète, à l'aide d'autres systèmes double hybride ou d'autres constructions, sont actuellement envisagées pour la poursuite de cette étude.

Electrophorèse capillaire

Les essais de mise en place d'une nouvelle méthode de dosage de l'activité de fixation du motif IRE à l'aide d'une sonde fluorescente et d'une méthode de séparation par électrophorèse capillaire n'ont pas invalidé cette approche, même s'ils n'ont pas encore abouti à un protocole établi. La sonde Oregon-IRE synthétisée et utilisée lors de nos essais, présente un phénomène de *quenching* de la fluorescence qui diminue le seuil de sensibilité de la méthode. Néanmoins, la séparation de différents pics sur le capillaire nu, ainsi qu'une évolution de certains de ces pics lors de l'ajout de la protéine IRP1, notamment des pics associés à la forme libre du fragment d'ARN, semblent montrer que cette nouvelle méthode est potentiellement utilisable. Pourtant, il semble évident qu'un nouveau substrat, mieux adapté au mode de détection par fluorescence, doit être synthétisé pour corriger les défauts observés. Pour cela l'utilisation de différents fluorophores, de différents espaceurs et l'utilisation de différentes séquences IRE sont envisagés afin de limiter les interactions entre le fluorophore et les bases ribonucléiques qui sont certainement à l'origine du phénomène de

quenching. Une fois ce substrat obtenu, la détermination des conditions optimales de séparation devront être déterminées, notamment le tampon de séparation qui ne doit pas dissocier le complexe ARN/protéine. Néanmoins, l'établissement de ces conditions sera facilité par l'existence de nombreux types de capillaires, notamment ceux remplis de gels (type acrylamide ou autres) qui présentent des pouvoirs résolutifs plus élevés que ceux utilisés lors de nos essais.

Etude structurale

Grâce aux quantités et à la pureté des solutions de rhIRP1 obtenues, une étude structurale des deux formes actives de la protéine en solution a pu être mise en place.

La diffusion des neutrons a permis de démontrer que la forme aconitase est plus compacte que la forme capable de fixer le motif IRE, caractérisée par un rayon de giration plus grand. Ce changement de conformation générale de la protéine, lors de la perte du centre fer-soufre, a pu être associé à une modification de structure secondaire de la protéine, grâce à l'étude des différentes formes par dichroïsme circulaire. Le passage de la forme aconitase vers la forme capable de fixer le motif IRE est lié à une perte d'éléments de structure secondaire (hélices α , feuillets β). Le changement de conformation générale est en accord avec le modèle structural de la protéine IRP1 qui admet une réorganisation de la structure pour pouvoir accommoder le motif d'ARN au niveau de ses sites d'interactions et aussi en accord avec la plus forte susceptibilité de la protéine capable de lier l'ARN, vis à vis des protéases. Notre travail montre que l'agrégat fer-soufre, qui est nécessaire à l'activité aconitase de la protéine, apparaît maintenant comme un élément important de la structure de la protéine en liant ses différents domaines. Nous avons aussi montré que cette perte de l'agrégat s'accompagne, directement ou indirectement, de la perte d'éléments de structure secondaire.

L'étude de la fixation du motif d'ARN sur la protéine a aussi été effectuée à l'aide de ces deux méthodes structurales. Par diffusion des neutrons, un état de compacité intermédiaire, entre la forme aconitase et la forme capable de lier l'ARN, a été caractérisé pour la forme de rhIRP1 liant l'IRE. Par dichroïsme circulaire, une nouvelle modification de la structure a pu être observée, se caractérisant par un léger gain d'élément de structure secondaire (hélices α , feuillets β), mais qui ne compense pas la perte observée lors du démantèlement de centre [4Fe-4S]. De plus, la protéine semble induire une modification

structurale de la tige boucle IRE lors de la fixation, comme le montre la modification du spectre CD dans la zone spécifique de l'ARN.

En perspective de cette étude structurale de la protéine rhIRP1, des études de cristallogénèse ont été amorcées, en collaboration avec le Laboratoire de Cristallographie et Cristallogénèse des Protéines, IBS, Grenoble, France, en vue d'obtenir une structure cristallographique aux rayons X à haute résolution de la protéine. Les essais portent majoritairement sur la forme aconitase, mais des essais sur la forme démétallée, ainsi que des tests de co-cristallisation de cette dernière forme en présence du motif IRE sont en cours.

VIII-A Matériel Biologique

VIII-A-1 Souches Procarvottes

- *Escherichia coli* DH5 α : F $^{-}$ Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 *endA1 recA1 hsdR17*(r $_{K}^{-}$ m $_{K}^{+}$) *deoR thi-1 phoA supE44 λ^{-} gyrA96 relA1*. Souche utilisée pour le clonage et l'amplification des plasmides. Commercialisée par GIBCO BRL sous forme de bactéries compétentes.
- *Escherichia coli* K38/pGP1-2 : HfrC (λ). Souche contenant le plasmide pGP1-2 et utilisée pour la surproduction de protéines recombinantes. Don du Pr S. Tabor, Harvard Medical School, Boston, USA.
- *Escherichia coli* HB101 : Δ (*gpt-proA*)62 *leuB6 thi-1 lacY1 hsdS_B20 recA rpsL20*(Str r) *ara-14 galK2 xyl-5 mlt-1 supE44 mcrB_B*. Utilisée pour l'amplification des plasmides sélectionnés de la banque d'ADNc pour lesquels l'auxotrophie pour la leucine permet de maintenir dans les bactéries la pression de sélection pour les plasmides dérivés de pGAD. Don du Dr M-C. Dagher, BBSI, DBMS, CEA Grenoble, France.

VIII-A-2 Souches Eucaryotes

- *Saccharomyces cerevisiae* L40 : *MATa, trp1, leu2, his3, LYS::lexA-his, URA3::lexA-lacZ*. Utilisée comme hôte des plasmides dérivés de pGAD et pLEX. Souche fournie par le Dr M-C. Dagher, BBSI, DBMS, CEA Grenoble, France.
- K562 S : Lignée cellulaire d'une leucémie myéloïde humaine.
- K562 R : Lignée dérivée de la lignée parentale K562 S , ayant développé une résistance à la doxorubicine.
- GLC4 S : Lignée cellulaire d'un carcinome pulmonaire humain à petites cellules présentant la particularité d'être semi-adhérente.

- GLC4^R : Lignée dérivée de la lignée parentale GLC4^S, ayant acquis une résistance à la doxorubicine.

Les différentes lignées K562 et GLC4 sont cultivées par M. Andriollo, LBSO, Faculté de Pharmacie, Grenoble, France, dans un milieu RPMI 1640 (Life Technologies, S^T Quentin en Yvelines, France) avec 10% de sérum fœtal de bœuf et 2 mM de glutamine sous une atmosphère humidifiée à 95% d'air et 5% de CO₂ à 37°C.

VIII-A-3 Plasmides

- pGP1-2 : Le plasmide pGP1-2 (Figure VIII-1) code pour l'ARN polymérase du phage T7 sous le contrôle du promoteur p_L du phage λ. Il code aussi pour le répresseur thermosensible cI857 qui inhibe la transcription à partir du promoteur λ p_L à des températures inférieures à 30°C. Cet inhibiteur est placé sous le contrôle du promoteur d'*Escherichia coli* p_{lac}. Ce plasmide porte le gène de résistance à la kanamycine et une origine de réplication p15A pour sa propagation sur milieu sélectif.
- pT7-5 & pT7-7 : Les vecteurs pT7-5 et pT7-7 sont basés sur l'utilisation du promoteur (Φ10) de l'ARN polymérase du phage T7 pour l'expression de gènes. Ils possèdent chacun le gène de résistance à l'ampicilline et une origine de réplication bactérienne (ColE1 *ori*) pour la propagation sur milieu sélectif. Le vecteur pT7-7 possède la séquence promotrice d'un gène du phage T7 fortement exprimé (gène 10), avec un site de forte affinité pour la fixation au ribosome (rbs) et un codon d'initiation de la transcription (ATG), en amont du site de clonage multiple. Ce plasmide est donc préférentiellement utilisé pour la surproduction des protéines recombinantes dont le gène est dépourvu de séquence promotrice adaptée à l'expression bactérienne. Don du Pr S. Tabor, Harvard Medical School, Boston, USA (Tabor et Richardson 85).

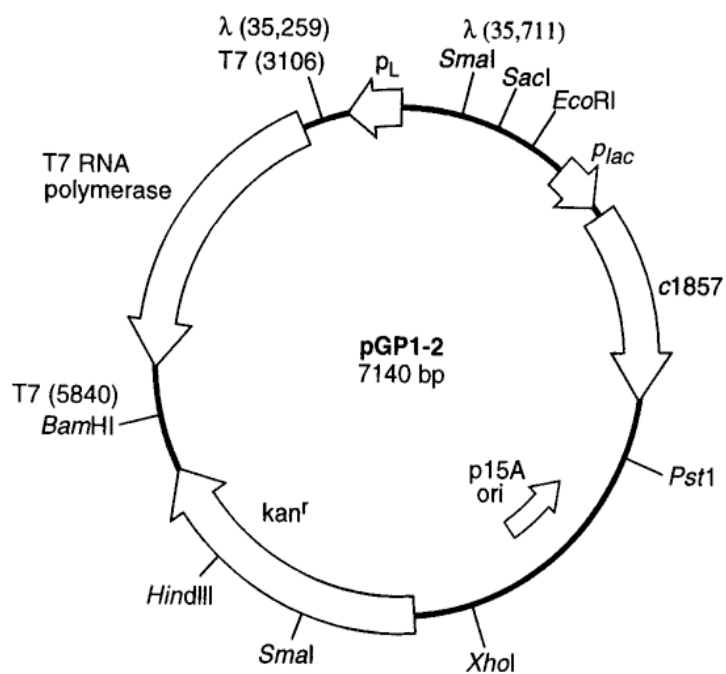


Figure VIII-1 : Plasmide pGP1-2

- pT7-His-hIRF (Gray *et coll.* 1993) : Plasmide dérivé de pT7-7 (voir ci-dessus) codant pour la protéine IRP1 humaine fusionnée à une ancre histidine en position N-terminale. Don du Dr K. Pantopoulos, EMBL-Heidelberg, Allemagne.
- pI12-CAT (Gray *et coll.* 1993) : Plasmide codant pour la partie 5' non traduite de la sous-unité H de la ferritine humaine, contenant le motif IRE représenté sur la figure I-5. Don du Dr K. Pantopoulos, EMBL-Heidelberg, Allemagne.
- pLEX11 (Figure VIII-2) : Plasmide utilisé pour l'expérience de double hybride. Il permet la synthèse de la protéine de fusion entre l'« appât » et le domaine liant d'ADN, correspondant au répresseur LexA, positionné à l'extrémité N-terminale. Le plasmide contient aussi le gène TRP1 qui permet la croissance sur un milieu sélectif sans tryptophane par complémentation du phénotype *trp⁻* de la souche de levure L40 transformée par ce plasmide. Il possède une origine de répllication bactérienne (*ColE1 ori*) et contient le gène de résistance à l'ampicilline ce qui donne un autre moyen de sélection dans *E. coli*. Don du Dr M-C. Dagher, BBSI, DBMS, CEA Grenoble, France.
- pGAD (Figure VIII-2) : Plasmide utilisé dans l'expérience de double hybride. Il permet la synthèse de protéine de fusion entre la « proie » et le domaine activateur de la protéine Gal4, situé à l'extrémité N-terminale. Le vecteur contient aussi le gène LEU2 qui permet la croissance sur un milieu sélectif sans leucine de la souche de levure transformée par ce plasmide par complémentation du phénotype *leu⁻*. Comme pLex11, il possède une origine de répllication bactérienne (*ColE1 ori*) et le gène de résistance à l'ampicilline. Don du Dr M-C. Dagher, BBSI, DBMS, CEA Grenoble, France.
- pLEX-Lamine : Plasmide utilisé comme contrôle dans l'expérience de double hybride et dérivé de la famille du plasmide pLEX11 dont il reprend les caractéristiques fondamentales (résistance, origine de répllication, etc...). Il code pour une fusion composée du fragment de liaison à l'ADN (LexA) en position N-terminale et de la lamine. Cette fusion est utilisée pour analyser les cibles qui peuvent correspondre à des « faux positifs » de par leur interaction non spécifique avec l'appât. Don du Dr M-C. Dagher, BBSI, DBMS, CEA Grenoble, France.

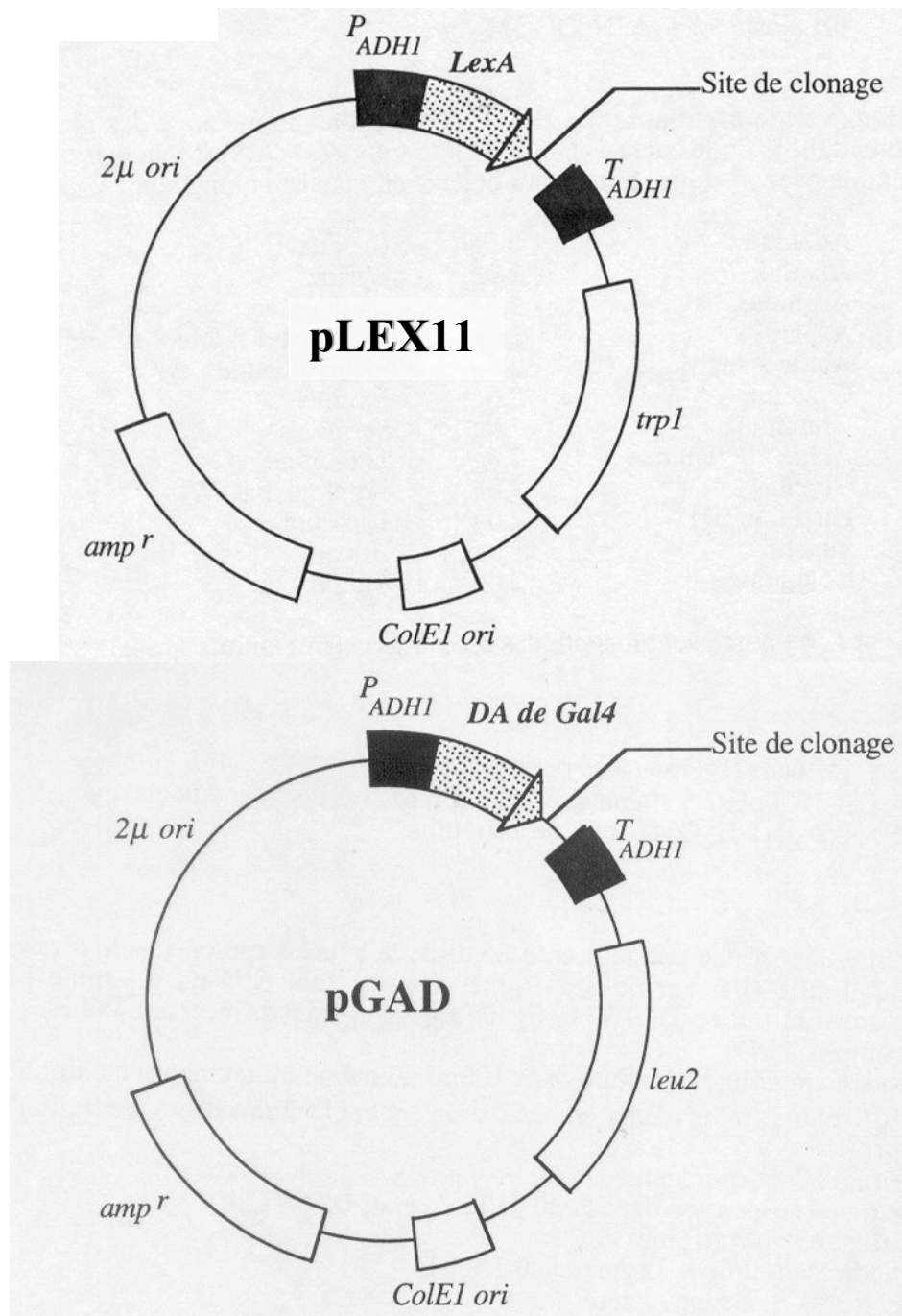


Figure VIII-2 : Représentation schématique des plasmide pLEX11 et pGAD utilisés dans l'expérience de double hybride.

VIII-B Tampons et milieux

VIII-B-1 Tampons

Tampon d'électrophorèse TAE : Tris / Acétate / EDTA (10x concentré).

48.4 g Tris

11.4 ml d'acide acétique

7.4 g Na₂EDTA

H₂O qsp 1 litre

Tampon d'électrophorèse TBE : Tris / Borate / EDTA (10x concentré).

108 g Tris

55 g d'acide borique

40 ml EDTA 0.5M pH 8.0

Tampon d'électrophorèse SDS-PAGE.

25 mM Tris-Cl

0.2 M Glycine

0.1% SDS (p/v)

pH 8.4

Solution de coloration SDS-PAGE.

0.025% Bleu de Coomassie R-250 (p/v)

50% Méthanol (v/v)

10% Acide Acétique (v/v)

Solution de décoloration SDS-PAGE.

10% Méthanol (v/v)

10% Acide Acétique (v/v)

Tampon de transfert (Western Blot).

25 mM Tris-Cl
0.2 M Glycine
10% Méthanol (v/v)
pH 9.0

Tampon TBS (*Tris Buffer Saline*).

100 mM Tris-Cl pH 7.5
150 mM NaCl

Tampon T-TBS (*Tween-TBS*).

0.1% Tween20 (v/v) dans TBS

VIII-B-2 Milieux

Milieu minimal : milieu utilisé pour l'étape de transformation des cellules HB101 dans l'étude double hybride.

Milieu minimal M9 (Gibco BRL) (6 g Na_2HPO_4 , 3 g KH_2PO_4 , 1 g NH_4Cl)/l
Glucose 0.2% (v/v) final
 MgSO_4 1 mM final
Vitamine B1 1 mg/l
 H_2O qsp 1litre.

20 g de bacto-agar (Difco) sont ajoutés à la solution pour obtenir un milieu solide.

LB/Agar : (Lennox L Agar - Gibco BRL), pour la sélection des différentes souches d'*Escherichia coli*.

Peptone 140, extrait de levure, NaCl, Agar (10:5:5:12), 32 g/l

LB : (Miller's LB Broth Base - Gibco BRL) pour la croissance des différentes souches d'*Escherichia coli*.

Peptone 140, extrait de levure, NaCl (10:5:10) 25g/l

TB : (Terrific Broth - Gibco BRL) pour la croissance des différentes souches d'*Escherichia coli*.

Peptone 140, extrait de levure, K₂HPO₄, KH₂PO₄ (118:23.6:9.4:2.2) 47 g/l

Milieu YPD : Milieu complet, utilisé pour la croissance de la souche L40 de *Saccharomyces cerevisiae*.

10 g d'extrait de levure (Difco)

20 g de bacto-peptone (Difco)

20 g de glucose

H₂O qsp 1 litre, ajusté à pH 7 avec NaOH 5M.

20 g de bacto-agar (Difco) sont ajoutés à la solution pour obtenir un milieu solide.

DO-I (-II et -III) : Mélange des différents acides aminés.

2 g de chaque acide aminé (Sigma), 4g pour la Leucine.

moins le Tryptophane pour le DO-I

moins le Tryptophane et la Leucine pour le DO-II et

moins le Tryptophane, la Leucine et l'Histidine pour le DO-III.

0.5 g d'Adénine (Sigma)

2 g d'Inositol (Sigma)

2 g d'Uracile (Sigma)

0.2 g d'acide *para*-aminobenzoïque (Sigma)

Milieu DO-I (-II ou -III) :

6.7 g d'extrait de levure sans acides aminés (Difco)

20 g de glucose

2 g DO-I (-II ou -III)

H₂O qsp 1 litre, ajusté à pH 7 avec NaOH 5M.

20 g de bacto-agar (Difco) sont ajoutés à la solution pour obtenir un milieu solide.

Le milieu DO-I (-Trp) est utilisé pour le maintien et la croissance des souches L40 de *Saccharomyces cerevisiae* transformées par un plasmide dérivé de pLEX11, alors que le milieu DO-II (-Trp, -Leu) est utilisé pour la croissance des souches L40 doublement transformées par un plasmide dérivé de pLEX11 et un plasmide dérivé de pGAD. Enfin, le milieu DO-III (-Trp, -Leu, -His) est utilisé pour analyser l'interaction entre les deux protéines fusion dans les souches L40 doublement transformées par un plasmide dérivé de pLEX11 et un plasmide dérivé de pGAD.

VIII-C Méthodes générales de biologie moléculaire

VIII-C-1 PCR (Polymerase Chain Reaction)

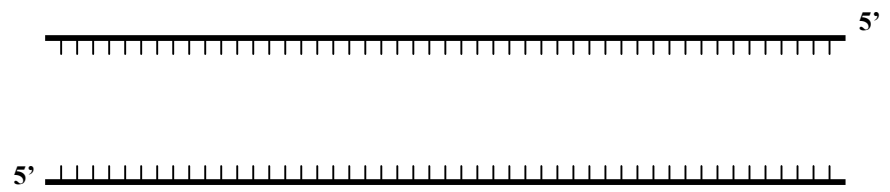
L'amplification en chaîne par réaction avec la polymérase (PCR) consiste à amplifier de manière rapide et efficace un fragment d'ADN double brin *in vitro* (Saiki *et coll.* 1998). La connaissance de la séquence des régions flanquant le fragment à amplifier permet la synthèse de deux oligonucléotides complémentaires à ces régions et convergents (Figure VIII-3). Ceux-ci sont utilisés comme amorces pour l'ADN polymérase.

L'amplification s'effectue par la répétition cycles successifs en 3 phases :

- La première étape consiste en une étape de dénaturation du double brin d'ADN par chauffage de 30 secondes en général à 94°C (Figure VIII-3-A).
- La seconde étape correspond à l'hybridation des oligonucléotides avec les simples brins d'ADN dénaturé (Figure VIII-3-B). Cette réaction se déroule

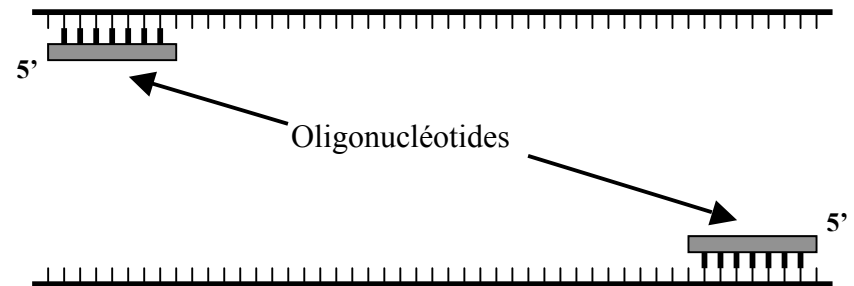
A

Dénaturation



B

Hybridation



C

Elongation

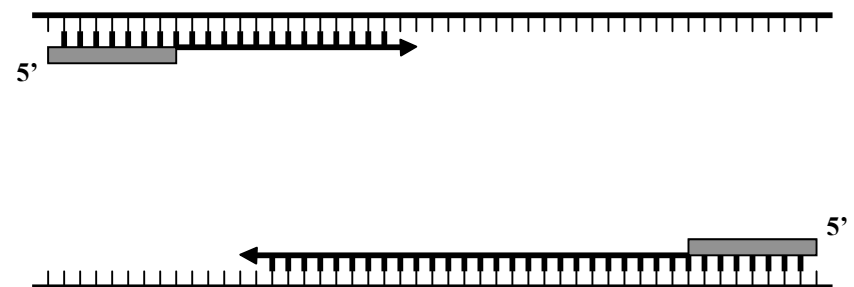


Figure VIII-3 : Schéma de l'expérience de PCR

durant 30 secondes à une température inférieure à la température d'hybridation (T_m) des deux oligonucléotides, dépendante de leurs séquences respectives.

- Durant la troisième étape, nommée élongation, le nouveau brin est synthétisé par l'ADN polymérase en présence des différents désoxynucléotides, à partir des deux amorces (Figure VIII-3-C). Cette dernière étape s'effectue durant 1 minute à 74°C grâce à l'utilisation d'ADN polymérases thermostables capables de résister aux étapes de dénaturation.

Les principales polymérases utilisés sont la *Taq* polymerase (Boehringer, Appligene, ou Fermentas) et la *Pwo* (Roche). Cette dernière, contrairement à la première, présente une activité exonucléase 3'→5' correctrice. De ce fait le fragment amplifié par cette enzyme contient moins d'erreurs que celui engendré par la *Taq*. C'est pourquoi la *Pwo* est préférentiellement utilisée pour l'amplification de grands fragments, alors que la *Taq* est plutôt utilisée pour l'amplification de petits fragments dans des applications analytiques.

En pratique, quelques nanogrammes de matrice d'ADN sont incubés en présence de 5 µM de chaque oligonucléotide dans 10 mM Tris-Cl pH 8.3 / MgCl₂ 1 mM / KCl 50 mM / gélatine 0.1 mg/ml dans le cas de l'utilisation de la *Taq* polymérase ou 10 mM Tris pH 8.8 / 25 mM KCl / 5 mM (NH₄)₂SO₄ / 2 mM MgSO₄ dans le cas de la *Pwo*. Le volume final est ajusté à 50 µl et la solution dénaturée à 94°C durant 2 minutes. Après retour à 25°C, 400 µM de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) et 5 unités de polymérase sont ajoutés et le microtube placé dans un appareil de PCR (GeneAmp PCR System 2400 - Perkin Elmer) qui permet la programmation des différentes étapes (températures, durée et nombres de cycles). Après amplification, le produit est analysé sur gel d'agarose, purifié par extraction au phénol et précipitation à l'éthanol.

Les différents oligonucléotides utilisés au cours de thèse pour l'amplification ou la modification de différents fragments d'ADN, sont répertoriés dans le tableau VIII-1.

Nom	Séquence 5'→3'	Fournisseur
ACT-AS	cagtatctacgattcat	*
DHB	gcctacaggatccgcaccagaccc	GIBCO BRL
FT7-5	cgcgcgaggcccagctggcttatcg	GIBCO BRL
GAD-F	gatgaagataccccaccaaacc	GIBCO BRL
HFRIRE1	cggtagccggaattcctgcttcaacag	GIBCO BRL
HFRIRE2	cctgaaaatctcgtcgaagctgac	GIBCO BRL
O4b	taatacgactcactataggg	GIBCO BRL
NS1	ggatccatcagtacatatgagcaaccattcgc	Génome Express
NS3	gccgtaaagtcctgcaggatgacacg	Génome Express
RTI-1	gaggatccgtccaagcactg	GIBCO BRL

Tableau VIII-1 : Les différents oligonucléotides utilisés pour l'amplification des différents fragment d'ADN utilisés au cours de cette thèse.

(* = don du Dr M-C. Dagher, BBSI, DBMS, CEA Grenoble, France)

VIII-C-2 Digestion par les endonucléases de restriction

Les enzymes de restriction coupent l'ADN double brin au niveau de séquences spécifiques de chaque enzyme. Le tableau VIII-2 répertorie les différentes enzymes utilisées au cours de ces travaux ainsi que leur différentes caractéristiques (séquences reconnues et tampon de digestion associé).

VIII-C-3 Analyse et purification des fragments oligonucléotidiques sur gel d'agarose

L'analyse de la taille des différents brins d'ADN ou d'ARN s'effectue par électrophorèse sur un gel d'agarose (Multipurpose Agarose - Appligene) dont la concentration dépend de la taille du fragment à observer, dans un tampon TAE ou TBE. Après migration à voltage constant, la révélation s'effectue en colorant le gel durant 20 minutes par l'ajout de 2 µl d'une solution de bromure d'éthidium 5mg/ml dans 100 ml d'eau. Après décoloration dans l'eau durant 20 minutes, les bandes d'acides nucléiques sont visualisés par illumination UV (312 nm) et leur taille comparée à celle d'un mélange de fragments d'ADN de tailles connues (marqueurs de poids moléculaire - Boehringer Mannheim).

Dans le cas d'une purification sur gel d'agarose d'un fragment d'ADN, un autre type d'agarose est utilisé (Nusieve-GTG - FMC Bioproducts). Il présente la caractéristique d'avoir un point de fusion plus bas que l'agarose utilisé pour l'analyse. Après migration et révélation, la bande d'intérêt est soigneusement découpée, pesée et 3 volumes de 40 mM Bis-Tris pH 6.0, 40 mM NaCl sont ajoutés et mis à incuber sous agitation durant 1 heure. Le tampon est ensuite retiré et le gel est fondu à 70°C durant 20 minutes, puis la température est abaissée à 45°C pendant au minimum 10 minutes. A cette température l'agarose à bas point de fusion ne se solidifie pas et permet le traitement du gel par 1 unité/(600 mg de gel à 1%) de GELase (Epicentre Technologies) durant une heure à 45°C. La solution d'ADN est ensuite purifiée par précipitation à l'éthanol).

Nom	Séquence reconnue	Tampon de digestion	Fournisseur
<i>Bam</i> HI	G GATCC CCTAG G	B	Boehringer
<i>Eco</i> RI	G AATTC CTTAA G	H	Boehringer
<i>Hind</i> III	A AGCTT TTCGA A	B	Boehringer
<i>Kpn</i> I	GGTAC C C CATGG	L	Boehringer
<i>Nde</i> I	CA TATG GTAT AC	H	Boehringer
<i>Pst</i> I	CTGCA G G ACGTC	H	Boehringer
<i>Pvu</i> II	CAG CTG GTC GAC	M	Gibco
<i>Xba</i> I	T CTAGA AGATC T	H	Boehringer

Tableau VIII-2 : Caractéristiques des différentes enzymes de restrictions utilisées au cours de cette thèse.

Tampon B : 10 mM Tris-Cl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM 2ME, pH 8.0

Tampon H : 50 mM Tris-Cl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7.5

Tampon L : 10 mM Tris-Cl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7.5

Tampon M : 10 mM Tris-Cl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7.5

VIII-C-4 Extraction de l'ADN(ARN) par une solution de Phénol / Chloroforme / Alcool Isoamylique

Afin de séparer les protéines contenues dans une solution d'ADN (ARN), un volume de solution de Phénol/Chloroforme/Alcool Isoamylique (25:24:1) est ajouté et la solution fortement homogénéisée sur un agitateur. Les solvants organiques dénaturent les protéines qui s'accumulent à l'interface des phases organique et aqueuse après centrifugation pendant 30 secondes à 12000 g. La phase aqueuse contenant l'ADN(ARN) est conservée dans un tube stérile de 1.5 ml et la phase organique est de nouveau extraite par 100 µl d'eau stérile (traitée DEPC pour l'ARN). Après une nouvelle centrifugation, les phases aqueuses sont réunies et l'ADN (ARN) concentré par précipitation à l'éthanol.

VIII-C-5 Purification de l'ADN(ARN) par précipitation à l'éthanol

L'ADN(ARN) peut être concentré en précipitant les acides nucléiques en présence d'éthanol et de cations monovalents. Pour cela, à un volume d'une solution d'ADN(ARN) est ajouté 1/10^e de volume d'une solution d'acétate de sodium 3M stérile et 2 volumes (2.5 volumes pour l'ARN) d'éthanol pur pour les fragments de taille supérieure à ~100 (p)b. La solution bien mélangée est équilibrée à -80°C afin de faciliter la précipitation puis centrifugée 1/2 heure à 4°C et 12000g. Le culot obtenu est rincé à l'éthanol 70% (100 µl) pour récupérer les sels résiduels et permettre leur élimination. Après une nouvelle centrifugation (10 minutes à 4°C, 12000 g), le culot d'acides nucléiques est séché à l'air puis dissous dans l'eau stérile (traitée DEPC pour l'ARN) et la solution conservée à -20°C.

VIII-C-6 Déphosphorylation par traitement aux phosphatases

Les phosphatases catalysent l'hydrolyse de la fonction 5'-phosphate en 5'-OH de l'ADN. Ceci permet d'éviter la recircularisation des plasmides digérés ou la ligation en chaîne de certains oligonucléotides. L'utilisation d'une phosphatase thermosensible (Heat Killed Thermolabile Phosphatase (HKP) - Epicentre Technologies) permet d'inactiver cette dernière après réaction simplement en incubant la solution à 65°C.

Pour cela d'ADN à traiter est dilué dans le tampon TA (33 mM Tris-acétate pH 7.8, 66 mM acétate de potassium, 10 mM acétate de magnésium, 0.5 mM DTT), complété par 5 mM

de chlorure de calcium et incubé 5 minutes à 30°C avant l'ajout de l'enzyme. 1 unité/(µg d'ADN) de HKP est ajoutée et la solution incubée durant une heure à 30°C, puis la protéine est inactivée par chauffage à 65°C durant 15 minutes.

VIII-C-7 Ligaturation

Les ligases catalysent la formation des liens phosphodiester entre l'extrémité 5'-phosphate et l'extrémité 3'-OH d'un duplex d'ADN, via l'hydrolyse d'ATP. *In vivo* cette activité est utilisée pour réparer la coupure simple-brin de l'ADN double brin. *In vitro* cette activité est dérivée afin de lier deux fragments d'ADN double-brin aux extrémités complémentaires, notamment en permettant d'insérer certains fragments d'ADN d'intérêt dans un plasmide.

Pour cela, l'ADN double-brin à insérer est incubé à 18°C en présence de 200 ng de plasmide linéarisé. Les extrémités complémentaires des morceaux d'ADN s'hybrident dans le cas d'extrémités cohésives et la solution est placée dans 66 mM Tris pH 7.5 / 5 mM MgCl₂ / 1 mM DTT / 1 mM ATP. 0.5 unité de T4 DNA ligase (Boehringer), la ligase extraite du phage T4, est ajoutée et le milieu incubé à 18°C durant une nuit. Le produit obtenu est ensuite utilisé pour transformer des cellules compétentes.

VIII-C-8 Transformation des cellules d'*Escherichia coli* (DH5α et K38/pGP1-2)

L'étape de transformation des cellules compétentes d'*Escherichia coli* consiste à introduire dans la cellule de la bactérie un plasmide d'intérêt pour sa réplication. Cette étape nécessite l'utilisation de cellules dites compétentes, capables d'acquérir de manière efficace du nouveau matériel génétique.

VIII-C-8-a Préparation de cellules compétentes

Une colonie isolée d'*Escherichia coli* sert à inoculer 2 ml de LB. Ceux-ci sont incubés 15 heures à 20°C et 500 µl de pré-culture sont utilisés pour inoculer 50 ml de LB frais. Ces derniers sont incubés à 20°C jusqu'à atteindre une DO de 0.4 à 600 nm. La culture est alors placée à 4°C durant 15 minutes, puis centrifugée (10 minutes, 4°C, 1500g). Le culot est repris doucement par 1 ml de LB frais à 4°C et la suspension diluée dans 2.5 ml de Glycérol 36%,

PEG 6000 12%, MgSO_4 12 mM dans du tampon LB, à 4°C. Toujours à 4°C, la solution est aliquotée puis conservée à -80°C pour un usage ultérieur.

VIII-C-8-b Transformation

Pour cela 50 μl d'une solution de cellules compétentes d'*Escherichia coli* (DH5 α , K38/pGP-2) sont incubés à 4°C en présence de 100 ng de plasmide à insérer durant 30 minutes, puis la solution est soumise à un choc thermique, 42°C durant 1 minute, qui permet aux cellules stressées d'intégrer le plasmide. La solution est ramenée à une température de 4°C et 1 ml de LB stérile est ajouté. La suspension est incubée durant une heure à 37°C sous une légère agitation. Après récolte des cellules, 5000 g durant 30 secondes, le culot cellulaire est repris dans 100 μl de LB stérile et étalé sur un milieu solide sélectif, dépendant du gène de résistance porté par le plasmide.

VIII-C-9 Purification de plasmide

Pour des raisons pratiques, il est parfois nécessaire de produire de grandes quantités de plasmide pour en faciliter la caractérisation ou son utilisation. Pour cela, une colonie isolée sur son milieu sélectif est utilisée pour ensemencer 2.5 ml de TB en présence des antibiotiques nécessaires au maintien de la sélectivité. Après une incubation d'une nuit à 37°C sous agitation (220 tpm), les plasmides sont purifiés selon la méthode de lyse alcaline (Birnboim et Doly 1979) à l'aide d'un kit commercial (Easy Prep® Plasmid Prep Kit - Pharmacia).

VIII-D Méthodes biochimiques générales

VIII-D-1 Dosage de la concentration des protéines

La concentration des protéines est déterminée par la méthode spectrophotométrique de Bradford (Bradford 1976) à l'aide du kit commercial "Biorad Protein Assay" (Biorad). La méthode est basée sur la détection du complexe formé entre le colorant Coomassie Brilliant Blue G-250 et les protéines. Lors de la formation de ce complexe, l'absorbance de la solution à 465 nm se décale vers le bleu (595 nm) et la concentration est déterminée par comparaison

avec une courbe étalon effectuée à l'aide d'une solution d'albumine sérique bovine de concentration connue.

VIII-D-2 Dosage de la concentration d'ADN(ARN)

La concentration de l'ADN(ARN) s'effectue par spectrophotométrie à 260 nm, en considérant qu'une absorbance de 1, pour un trajet optique de 1 cm, correspond à 50 µg/ml d'ADN double brin (40 µg/ml d'ARN simple brin).

VIII-D-3 Analyse des protéines sur gel dénaturant de polyacrylamide

La composition en protéines d'un mélange est analysée sur un gel dénaturant de polyacrylamide. L'application de conditions dénaturantes et de dodecylsulfate a pour conséquence le chargement négatif et homogène de l'ensemble des protéines. Celles-ci sont séparées sur le gel selon leur rang de taille.

Pour cela, 3 à 5µg de protéines sont dénaturés durant 5 minutes à 95°C dans 62.5 mM Tris-Cl pH 6.8, glycérol 15%, SDS 2.3%, 2-ME 10%, bleu de bromophénol 0.001%. La solution est chargée sur une superposition de deux gels dénaturant de polyacrylamide. Le gel inférieur, nommé gel de séparation, est composé de 10% d'acrylamide/bis-acrylamide (A/BA) [37,5:1] (Appligène) dans un tampon 375 mM Tris pH 8.8 / SDS 0.1%. Ce gel sert à séparer les différentes protéines en utilisant le réseau de polyacrylamide comme tamis moléculaire. Le gel supérieur, 5% A/BA dans un tampon 125 mM Tris pH 6.8 / SDS 0.1%, est nommé gel de concentration. De faible concentration, il ne permet pas la séparation des protéines, mais il sert à les concentrer et permet ainsi une meilleure résolution des bandes. Un courant de 10 mA est appliqué durant 10 minutes, à travers le tampon d'électrophorèse SDS-PAGE (Cf chapitre VIII-B-1) 1x concentré, puis le courant est augmenté à 20 mA jusqu'à la migration du bleu de bromophénol au bas du gel (environ 50 minutes).

Après démoulage, le gel est plongé dans la solution de coloration SDS-PAGE (Cf chapitre VIII-B-1) durant 20 minutes, puis plongé dans la solution de décoloration SDS-PAGE (Cf chapitre VIII-B-1) jusqu'à l'apparition des bandes protéiques.

La taille des bandes visibles est obtenue par comparaison avec le profil de migration d'un mélange de diverses protéines, de poids moléculaire connu (Pharmacia).

VIII-D-4 Transfert sur membrane

La technique de Western Blot est mise en œuvre après transfert des protéines, initialement séparées sur un gel de polyacrylamide, sur une phase immobile (membrane de difluorure de polyvinylidène).

Pour cela la membrane utilisée, préalablement humidifiée par immersion dans une solution de méthanol pur puis une solution de tampon de transfert (20 mM Tris / 200 mM Glycine / 10% Méthanol) est placée sur le gel de polyacrylamide réalisé en condition dénaturantes comme décrit précédemment (Cf VIII-D-3), préalablement équilibré dans le même tampon de transfert durant 30 minutes. L'ensemble gel/membrane est placé en sandwich entre deux feuilles de papier Whatman 3MM et deux carrés d'éponges. L'ensemble est plongé dans le tampon de transfert, la membrane placée du côté de la cathode, et un courant de 200 mA est appliqué durant 2h 30 minutes.

VIII-D-5 Préparation des extraits cytosoliques des cellules eucaryotes

K562/GLC4

Les cellules sont centrifugées (2 minutes, 2660g, 4°C) et le culot lavé deux fois avec 5 ml de tampon PBS (1.37 M NaCl, 27 mM KCl, 80 mM Na₂HPO₄, 15 mM KH₂PO₄, pH 7.0). Le culot correspondant à 5x10⁶ cellules est rincé avec 250 µl d'une solution 10 mM HEPES, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.2 mM PMSF, 0.5 mM DTT pH 7.9, centrifugé et resuspendu dans 250 µl de ce même tampon hypotonique. La suspension est conservée 15 minutes à 4°C, homogénéisée et 0.5% (v/v) de Nonidet P-40 (Sigma) sont ajoutés. Après une brève homogénéisation de 10 secondes, les cellules lysées sont centrifugées à 16000g durant 30 secondes et le surnageant, correspondant à l'extrait cytosolique, est conservé après avoir dosé sa concentration protéique.

VIII-E Production et purification de rhIRP1

VIII-E-1 Clonage de la protéine IRP1 humaine

L'ancre poly-histidine sur le plasmide pT7-His-hIRF (Gray *et coll.* 1993) est supprimée en amplifiant par PCR un fragment de 283 paires de bases correspondant à l'extrémité 5' du gène intact de la protéine, à l'aide des oligonucléotides NS1 (Tableau VIII-1) qui permet l'insertion d'un site de restriction *NdeI* superposé au codon d'initiation et l'oligonucléotide NS3 (Tableau VIII-1).

Le fragment amplifié aux extrémités franches est digéré par *NdeI* et *PstI*, puis cloné dans le plasmide pT7-7 digéré par *NdeI-PstI*, pour former le plasmide pT-IRP4-AI-1 (Figure VIII-4). Ce dernier est clivé *PstI-HindIII* puis ligaturé avec le fragment *PstI-HindIII* du plasmide pT7-His-hIRF pour former le plasmide pT-IRP5-B2 codant pour la protéine IRP1 humaine entière et non modifiée (Figure VIII-4).

VIII-E-2 Production de rhIRP1

Pour la production de rhIRP1, le stock d'*Escherichia coli* K38/ pT-IRP5-B2 / pGP1-2 est étalé sur une boîte de LB Agar (75 µg/ml Amp / 50 µg/ml Kan) et mis en croissance une nuit à 30°C afin de ne pas inactiver l'inhibiteur thermosensible cI857. Une colonie isolée est utilisée pour ensemencer 2 ml de LB (75 µg/ml Amp / 50 µg/ml Kan) qui sont incubés une nuit à 30°C sous agitation (220 tpm). 1 ml de suspension de cellules est utilisé pour ensemencer 200 ml de LB (75 µg/ml Amp / 50 µg/ml Kan) et les cellules se multiplient à 30°C durant 8 heures sous agitation (220 tpm). Après centrifugation à 5000g pendant 15 minutes, le culot cellulaire est suspendu dans 25 ml de LB qui servent à ensemencer 22 x 1 litre de TB (100 µg/ml Amp / 75 µg/ml Kan) par fractions de 1 ml. Les milieux sont mis en croissance une nuit (15h) à 30°C sous agitation (150 tpm). La température est portée à 42°C durant 2 heures afin d'induire la synthèse l'ARN polymérase du phage T7 codée par le plasmide pGP1-2, par l'inactivation de l'inhibiteur thermosensible cI857. Cette polymérase synthétise alors spécifiquement le messager du gène (d'IRP1) situé en aval du promoteur $\Phi 10$ sur le plasmide dérivé de pT7-7. Enfin la température est abaissée à 30°C et les milieux incubés entre 3 et 6 heures pour produire IRP1. Les milieux de culture sont ensuite centrifugés à 3000 g durant 20 minutes à 20 °C et le culot cellulaire suspendu dans un

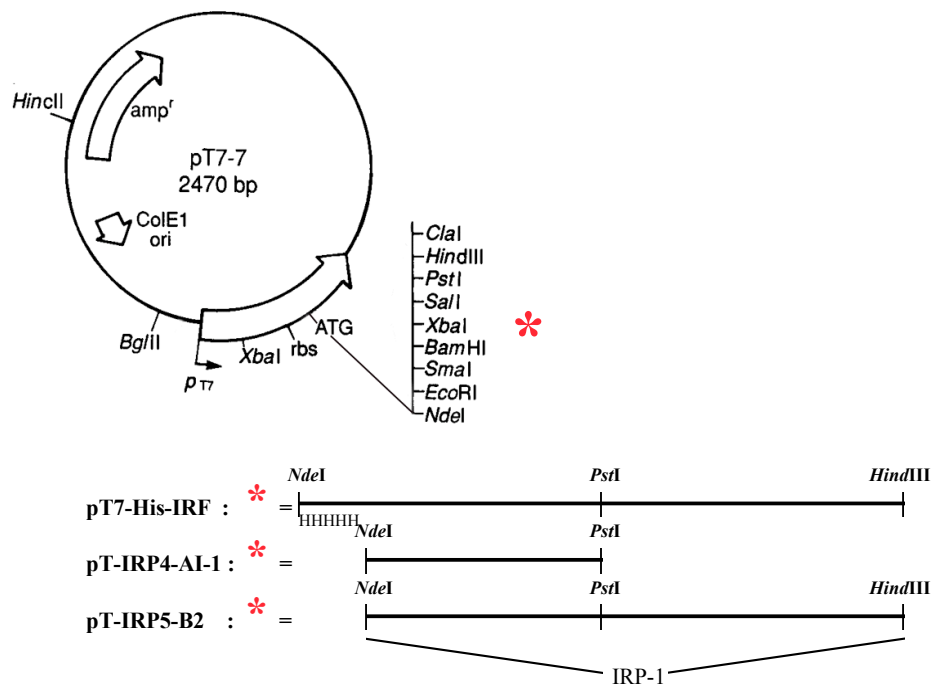


Figure VIII-4 : Représentation schématique des plasmides

pT7-His-IRF, pT-IRP4-AI-1 et pT-IRP5-B2.

minimum de tampon Tris-Cl 20 mM pH 7.0 / Citrate 5 mM / PMSF 100 μ M avant d'être conservé à -80°C.

VIII-E-3 Protocole de purification de rhIRP1

Le culot cellulaire obtenu (correspondant à ~150g masse humide) est décongelé en présence de 20 mg de lysozyme. La digestion de la paroi externe des cellules par le lysozyme, ainsi que la phase de congélation/décongelation, fragilisent les cellules, ce qui améliore le rendement de lyse des cellules dans l'étape suivante par traitement aux ultrasons.

La suspension de cellules est placée à 4°C dans 3 béchers de 100 ml, afin d'éviter la dégradation des protéines par échauffement de la solution, puis traitée aux ultrasons par un cycle de 2x 45' et 3x 30' à une puissance maximale de 380 W (Labsonic U - B.Braun). La solution obtenue est ensuite centrifugée à 20000g durant 90 minutes à 4°C et le surnageant utilisé pour la suite de la purification.

VIII-E-3-a Précipitation au sulfate d'ammonium

La première étape consiste en un fractionnement par précipitation différentielle des protéines au sulfate d'ammonium. Dans un premier temps, l'extrait cellulaire soluble est porté à 25% de la concentration de saturation en sulfate d'ammonium à 4°C (0.176 g/ml - 1.33 M). Après centrifugation à 12000g durant 1 heure à 4°C, la concentration de sulfate d'ammonium de la solution est portée à 65% de la concentration de saturation (0.458 g/ml - 3.46 M). Après une nouvelle centrifugation d'une heure à 12000g (4°C), le culot obtenu est dissous à l'aide d'un minimum de tampon 20 mM Tris pH 7.0 / Citrate 5 mM / PMSF 100 μ M (Tampon A) et dialysé une nuit contre 10 litres de ce même tampon.

VIII-E-3-b Chromatographie d'échange d'ions (CM52 / DE52)

La chromatographie d'échange de cations est réalisée sur une résine CM52 (carboxyméthyl cellulose, Whatman). Cette résine interagit spécifiquement avec les protéines chargées positivement, alors que dans le cas de la chromatographie d'échange d'anions, réalisée sur une résine DE52 (diéthylaminoéthyl cellulose, Whatman), ce sont les protéines chargées négativement qui interagissent.

Le dialysât obtenu après l'étape de précipitation à 65% de la concentration de saturation de sulfate d'ammonium est chargé sur deux colonnes échangeuses d'ions placées en série (50 ml de CM52 et 100 ml de DE52) équilibrées en Tampon A. Les fractions retenues sur les résines ne sont pas conservées et la fraction n'interagissant pas avec ces phases est utilisée pour la deuxième étape chromatographique.

VIII-E-3-c Chromatographie d'interactions hydrophobes

Cette étape met en jeu les interactions des résidus hydrophobes de la protéine avec des groupements hydrophobes greffés sur une matrice. La solution n'interagissant pas avec les groupements CM et DEAE à pH 7.0 est portée à 10 % de la concentration de saturation en sulfate d'ammonium (70.4 mg/ml - 0.54 M) puis chargée sur la résine d'interactions hydrophobes (Phenyl Sépharose 6 Fast Flow (high sub) - Pharmacia - 200 ml) équilibrée avec 20 mM Tris-Cl pH 7.0 / Citrate 200 μ M / 50 μ M PMSF / 10% de la concentration de saturation en sulfate d'ammonium (Tampon B). La résine utilisée est composée d'une matrice d'agarose réticulé substituée par des noyaux phényles comme groupes hydrophobes. Les protéines sont éluées par un tampon 20 mM Tris-Cl pH 7.0 / Citrate 200 μ M / 50 μ M PMSF, puis concentrées jusqu'à un volume d'une dizaine de millilitres sur une membrane PM30 (Amicon). La solution est dialysée une nuit contre un tampon 20 mM Tris pH 7.4 / Citrate 200 μ M / 1% Glycérol (Tampon C).

VIII-E-3-d Chromatographie par filtration sur gel

La solution de protéine est centrifugée 30' à 12000g avant d'être déposée sur une résine de filtration sur gel (Superdex 200 - Pharmacia - 500 ml) équilibrée en Tampon C. La fraction correspondant à la protéine IRP1 est alors concentrée sur membrane PM30 jusqu'à un volume final de 5 ml.

VIII-E-3-e Chromatographie liquide moyenne pression d'interactions hydrophobes

La solution de protéine est portée à 15% de la concentration de saturation en sulfate d'ammonium (105.6 mg/ml - 0.80 M), centrifugée 30' à 12000g et chargée sur une résine

d'interactions hydrophobes (Fractogel EMD Phenyl (S) - Merck - 15 ml) installée dans une colonne Superformance (Merck) et équilibrée avec un tampon 20 mM Tris pH 7.4 / Citrate 200 μ M / 15% de la concentration de saturation en sulfate d'ammonium (Tampon D). Celle-ci est développée par un gradient avec un tampon 20 mM Tris pH 7.4 / Citrate 200 μ M (Tampon E) selon le tableau VIII-3.

Les fractions contenant l'activité aconitase sont regroupées et concentrées sur membrane PM30 (Amicon) et la solution obtenue dialysée une nuit contre 1 litre de Tampon E.

VIII-E-3-f Chromatographie sur résine d'hydroxyapatite

La solution de protéine est centrifugée 30' à 12000g puis chargée, sur une colonne d'hydroxyapatite (Macro-Prep Ceramic Hydroxyapatite - Biorad - 15 ml) équilibré en Tampon E, sur le système Superformance. La colonne est développée à l'aide d'un gradient (Tableau VIII-4) d'un tampon 0.4 M de phosphate de potassium pH 7.0 / Citrate 200 μ M (Tampon F).

Les fractions contenant la protéine IRP1 sont regroupées et concentrées sur membrane PM30 (Amicon).

VIII-E-3-g Chromatographie liquide haute performance d'échange d'anions

La solution de protéine est centrifugée 30' à 12000g avant d'être finalement injectée sur une colonne échangeuse d'anions (PL-SAX 1000Å 150 x 7.5mm - Polymer Labs Ltd) sur un système de chromatographie liquide haute performance (CLHP) (Hewlett-Packard 1100). La colonne, initialement équilibrée en tampon 20 mM Tris pH 7.4 / Citrate 200 μ M (Tampon G), est développée avec un tampon 20 mM Tris pH 7.4 / Citrate 200 μ M / 0.4 M NaCl (Tampon H) selon le gradient mentionné sur le tableau VIII-5.

La fraction résultante correspondant à la protéine IRP1 est concentrée sur membrane PM30 (Amicon) puis dessalée par gel filtration (Sephadex G25 - Pharmacia) dans un tampon 20 mM Tris pH 7.4 avant d'être conservée en différents aliquotes dans l'azote liquide pour un usage ultérieur.

Temps (min)	% D	% E	[(NH ₄) ₂ SO ₄]
0	100	0	0.80 M
10	100	0	0.80 M
15	80	20	0.64 M
20	80	20	0.64 M
45	44	56	0.35 M
50	0	100	0
60	0	100	0
63	100	0	0.8 M
78	100	0	0.8 M

Tableau VIII-3 : Gradient utilisé pour l'étape de purification par interactions hydrophobes sur Fractogel EMD Phenyl (S).

Temps (min)	% E	% F	[KPi]
0	100	0	0
15	100	0	0
40	0	100	0.4 M
45	0	100	0.4 M
48	100	0	0
70	100	0	0

Tableau VIII-4 : Gradient utilisé lors de l'étape de purification sur Macro-Prep Ceramic Hydroxyapatite.

Temps (min)	% G	% H	[NaCl]
0	100	0	0
5	100	0	0
10	93.5	6.5	26 mM
30	87.5	12.5	50 mM
35	87.5	12.5	50 mM
40	0	100	0.4 M
45	0	100	0.4 M
47	100	0	0
57	100	0	0

Tableau VIII-5 : Gradient utilisé pour l'étape d'échange d'anions par CLHP.

VIII-E-4 Génération de la forme fixatrice du motif IRE de la protéine rhIRP1

La forme fixant le motif IRE de la protéine rhIRP1 est générée en incubant une solution de protéine recombinante sous forme aconitase à 100 μ M en présence de 0.2 M d'eau oxygénée et 10 mM d'EDTA durant deux heures à 4°C. La solution est ensuite chargée sur une colonne de pseudo affinité (Héparine Sépharose CL-6B - Pharmacia - 10 ml) équilibrée en Tris 20 mM pH 7.4 / DTT 1 mM (Tampon X). Le motif héparine greffé sur les billes de sépharose mime une chaîne polynucléotidique avec laquelle rhIRP1 interagit sous sa forme fixatrice du motif IRE. Après lavage, la protéine est éluée à l'aide d'un tampon Tris 20 mM pH 7.4 / 1 mM DTT / 0.5 M KCl. La solution de protéine est ensuite concentrée sur membrane (PM 30 / Amicon) et chargée sur une colonne de gel filtration (G25 fine - X - 15 ml) équilibrée en Tampon X pour être dessalée et de nouveau concentrée sur membrane (PM 30 - Amicon).

VIII-F Méthodes propres à l'étude de IRP1**VIII-F-1 Dosage de l'activité aconitase d'une solution**

Dans une cuve en quartz (Hellma) de 1 cm de chemin optique, contenant 50 mM Tris pH 7.4 / 200 μ M *cis*-aconitate dégazé par de l'argon, un aliquote de protéine à analyser est déposé au sommet de la cuve. L'anaérobiose est maintenue en bouchant la cuve à l'aide d'un septum puis la solution est rapidement mélangée et la disparition de l'absorbance du *cis*-aconitate ($\epsilon_{240\text{nm}} = 3600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) est suivie au cours du temps (un point toutes les 0.5 sec) pendant 1 à 2 minutes avec un spectrophotomètre HP 8452 ou 8453.

VIII-F-2 Modification du plasmide codant pour le motif IRE

La digestion préalable *Xba*I du plasmide pI12-CAT (Gray *et coll.* 1993) permet la synthèse *in vitro* d'une sonde nucléotidique reprenant le motif IRE d'une longueur de 60 nucléotides. La tige-boucle se situant à l'extrémité 3' du brin d'ARN néo-synthétisé, nous avons modifié le plasmide pI12-CAT afin de supprimer une partie de l'extrémité 5' inutile à la formation de la structure IRE.

Pour cela, le site *Bam*HI du plasmide pI12-CAT est remplacé par un site *Eco*RI, par mutagenèse dirigée à l'aide de l'oligonucléotide mutagène HFRIRE1 (Tableau VIII-1). La PCR réalisée conjointement avec un second oligonucléotide : HFRIRE2 (Tableau VIII-1) permet d'amplifier un fragment d'une taille voisine de 70 pb. Ce fragment est purifié sur gel d'agarose (NuSieve 4% / TBE), extrait au phénol et précipité à l'alcool, avant d'être digéré *Eco*RI/*Xba*I et inséré dans le plasmide pT7-5 préalablement digéré *Eco*RI/*Xba*I. Le plasmide obtenu, pTI-1, est utilisé pour la transformation de cellules DH5 α compétentes pour sa propagation.

Ce nouveau plasmide, pTI-1, ne contient que le motif IRE et quelques bases en 5' en aval du promoteur du phage T7 et avant le site *Xba*I. La transcription *in vitro* de ce plasmide permet un gain de 17 nucléotides non spécifiques par rapport au transcrit synthétisé à partir de pTI12-CAT, tout en étant parfaitement reconnu par les protéines IRP. En effet le motif IRE synthétisé à partir de cette construction est reconnu à la fois par la protéine recombinante humaine IRP1, la protéine recombinante humaine IRP2 et par différents extraits cytosoliques.

VIII-F-3 Préparation de la matrice pour la synthèse du motif IRE

Deux méthodes sont utilisées pour préparer la matrice nécessaire à la synthèse *in vitro* du brin d'ARN reprenant le motif IRE.

- Soit le plasmide pTI-1 purifié des bactéries DH5a/pTI-1, est préalablement digéré *Xba*I afin de linéariser la plasmide et stopper la synthèse d'ARN juste après la structure en tige-boucle.
- Soit un fragment de 90 paires de bases est amplifié à partir du plasmide pTI-1 à l'aide des oligonucléotides FT7-5 et RTI-1, par PCR et purifié. Le fragment obtenu contient le promoteur Φ 10 du phage T7 et la séquence codante pour le motif IRE. Cette méthode permet la synthèse de grandes quantités de matrice nécessaire à la synthèse de grandes quantités de sonde IRE.

VIII-F-4 Synthèse de la sonde IRE en présence de traceur radioactif

Pour le dosage de l'activité de fixation aux IRE, une sonde d'ARN reprenant le motif en tige-boucle, est synthétisée *in vitro* en présence de nucléotide marqué avec un isotope radioactif. Nous avons généralement utilisé du ^{33}P -UTP, qui présente l'avantage d'être moins énergétique et de posséder une demi-vie plus longue que son homologue ^{32}P , respectivement 0.249 MeV et 25.4 jours contre 1.709 MeV et 14.3 jours. Ceci permet d'utiliser la sonde IRE synthétisée sur une période plus longue sans une grande perte de sensibilité et avec une meilleure résolution des bandes visualisées sur gel d'acrylamide.

VIII-F-4-a Transcription *in vitro*

200 nM de matrice d'ADN (pTI-1 digéré *Xba*I ou fragment de pTI-1 amplifié par PCR) sont incubés dans 20 μl de tampon de transcription (en eau traitée DEPC) en présence de 1 mM d'ATP, 1 mM de CTP, 1 mM de GTP, 20 unités d'inhibiteur de ribonucléase de placenta humain (Boehringer, Sigma, ou Fermentas), 40 unités d'ARN polymérase du phage T7 et 60 μCi de ^{33}P -UTP. Après 40 minutes d'incubation à 37°C, 0.5 mM d'UTP non marqué est ajouté et la synthèse poursuivie durant 5 minutes à 37°C.

VIII-F-4-b Purification sur gel dénaturant de polyacrylamide

L'ARN synthétisé est placé dans 40 μl de tampon 80% Formamide / 10 mM NaOH / 1 mM EDTA / 0.1% Bleu de Bromophénol, et dénaturé 2 min à 85°C afin de détruire les structures secondaires. Il est purifié sur un gel dénaturant d'acrylamide (20% A/BA 19:1 / 7 M Urée / 0.5x TBE). Le gel, humide et recouvert d'un film de cellophane, sert à exposer un écran phosphorescent avant détection (PhosphoImager-Molecular Dynamics ou Molecular Imager-Biorad). Les bandes contenant la sonde IRE sont excisées et extraites par une solution 0.5 M d'acétate d'ammonium / EDTA 0.5 mM / SDS 0.1 % pendant une nuit sous agitation. La sonde ARN est ensuite extraite au phénol et précipitée à l'alcool. Les culots obtenus sont enfin dissous dans 15 à 20 μl d'eau traitée DEPC et conservés à -20°C avant utilisation.

VIII-F-5 Dosage de l'activité de fixation du motif IRE

L'activité de fixation de la protéine IRP sur le motif IRE s'effectue par la visualisation du retard de migration du complexe ARN/protéine par rapport à la sonde d'ARN libre.

Pour cela, la protéine (ou l'extrait cellulaire) est incubée dans 10 µl de tampon 10 mM HEPES pH 7.6, 40 mM KCl, 3 mM MgSO₄ en eau traitée DEPC en présence de 0.4 µCi de sonde IRE et 0.5 unité d'inhibiteur de ribonucléase (Boehringer, Sigma ou Fermentas), pendant 20 minutes à 37°C. Puis 1 unité de RNase T1 (Boehringer) est ajoutée pour éliminer l'excès de sonde libre et l'incubation est poursuivie durant 10 minutes à 37°C avant l'ajout d'un excès d'héparine (Sigma) (50 µg final), utilisée pour saturer les protéines n'ayant pas réagi. La solution est laissée 10 minutes à 37°C et finalement une solution à 50 % de glycérol / 0.05% bleu de bromophénol est ajoutée pour colorer et lester le mélange.

Les échantillons sont séparés sur un gel non dénaturant de polyacrylamide (6% A/BA 37.5:1 Appligène), ayant subi une pré-électrophorèse d'1 heure, dans un tampon 0.25x TBE (Tris, borate, EDTA) en chambre froide à un voltage constant de 80 V (~13 V/cm). Après migration, le gel est séché durant 1 heure, sous vide, à 70°C, entre une feuille de papier (Whatman 3mm) et un film de cellophane (Saran). Les bandes sont révélées par autoradiographie quantitative (PhosphoImager-Molecular Dynamics ou Molecular Imager-Biorad) après une nuit d'exposition.

VIII-F-6 Synthèse de la sonde IRE sans marquage radioactif

Pour la synthèse non radioactive de la sonde d'ARN, l'étape de transcription *in vitro* est réalisée à plus grande échelle afin d'obtenir de plus grandes quantités d'ARN. 100 nM de matrice d'ADN (pTI-1 digéré *Xba*I ou le fragment amplifié par PCR de ce même plasmide) sont incubés dans 500 µl de tampon de transcription en présence de 2 mM des différents nucléotides tri-phosphates, 500 unités d'inhibiteur de ribonucléase et 2000 unités d'ARN polymérase du phage T7. L'incubation est effectuée durant 3 heures à 37°C, puis la solution est extraite au phénol et précipité à l'éthanol. Comme pour la synthèse radioactive, l'IRE est purifié sur un gel dénaturant de polyacrylamide (20% A/BA / 7 M Urée). Le gel est ensuite démoulé sur une plaque chromatographique sur couche mince fluorescente (Whatman K5F) et

les bandes contenant la sonde IRE, visualisées par illumination UV à 254 nm, sont excisées puis purifiées en suivant la fin du protocole utilisé pour la sonde radioactive.

VIII-G Mise en œuvre des expérience ‘double-hydrise’ dans la levure

VIII-G-1 Préparation de la première construction (pLEX-T1)

La première construction utilisée correspond à l'essentiel du gène de la protéine IRP1 cloné au site *Bam*HI du plasmide pLEX11. Pour cela un fragment de 2.7 kpb est amplifié à l'aide des oligonucléotides DHB et O4b (1 μ M final) à partir de 2.5 ng de plasmide pT-IRP5-B2. Après purification par précipitation à l'éthanol, le fragment amplifié est digéré par 40 unités de *Bam*H1 pendant 2 heures à 37°C, puis purifié sur gel d'agarose (Seaplaque 1% / TAE). Le fragment est cloné dans le vecteur pLEX11 préalablement digéré par 5 unités de *Bam*H1 et traité avec 1 unité de Heat Killed Thermolabile Phosphatase (Epicentre Technologies), pour former le vecteur pLEX-T1. Ce plasmide sert à transformer des cellules DH5 α compétentes pour son amplification. Le séquençage a permis de s'assurer de l'insertion du gène dans le vecteur pLEX11, ainsi que de la conservation du bon cadre de lecture pour la synthèse de la fusion LexA-IRP1.

VIII-G-2 Préparation de la seconde construction (pLEX-F1)

Pour générer la seconde construction, correspondant au fragment 684-758 de la protéine IRP1, le plasmide pT-IRP5-B2 codant pour la protéine IRP1, est digéré par *Kpn*I, puis par *Pvu*II. Le milieu de digestion est traité avec 4 unités du fragment de Klenow de l'ADN polymérase (Boehringer Mannheim- l'ADN polymérase Klenow est la sous unité de l'ADN polymérase I de *E.coli* exempte de l'activité 5' \rightarrow 3' exonucléase), en présence de 50 μ M de dNTP afin de générer des extrémités franches. Le fragment d'ADN de 210 pb obtenu après purification sur gel d'agarose (Nusieve GTG 3% / TAE), est cloné dans le plasmide pLEX11. Celui-ci a été préalablement digéré par 40 unités de *Bam*H1, traité avec 4 unités de Klenow en présence de 50 μ M de dNTP afin de former des extrémités franches, et finalement traité par 2.5 unités de phosphatase (Heat Killed Thermolabile Phosphatase – Epicentre Technologies) afin d'éviter la recircularisation du vecteur. Le milieu de ligaturation est utilisé pour transformer des cellules compétentes DH5 α afin de produire le plasmide appelé

pLEX-F1 en quantité. Celui ci est séquencé afin de s'assurer du sens d'insertion correct de l'ADN dans le plasmide et de l'absence d'erreurs de séquence.

VIII-G-3 Titrage de la banque de cDNA de cerveau humain

La banque d'ADNc utilisée (Humain Brain MATCHMAKER - Clontech) a été réalisée à partir de l'ARNm total extrait du cerveau entier d'un homme de 37 ans de type caucasien. L'ADNc dérivé a été cloné dans le plasmide pGAD au site de restriction *EcoRI* et les plasmides ont servi à transformer des cellules d'*Escherichia coli* DH5 α .

Le calcul du titre de la banque d'ADNc est nécessaire pour estimer le nombre de boîtes de Pétri à utiliser pour son amplification afin de couvrir tous les clones indépendants présents dans la banque (1.2×10^6). Pour cela différentes dilutions de la solution stock de cellules DH5 α , variant d'un facteur 10 l'une par rapport à l'autre, sont étalées sur LB/Agar / 75 μ g/ml Amp et incubées durant une nuit à 37°C. Les cellules sont comptées et le titre de la banque d'ADNc utilisée déterminé à 10^8 cfu/ml.

VIII-G-4 Amplification de la banque de cDNA de cerveau humain

Pour le calcul du nombre de boîtes, l'analyse de deux fois le nombre de clones indépendants ($2 \times 1.2 \times 10^6 = 2.4 \times 10^6$) est souhaitée. En estimant à 10000 le nombre de colonies sur une boîte de 90 mm de diamètre avant confluence, il est nécessaire d'utiliser $(2.4 \times 10^6 / 10^4) = 240$ boîtes de LB/Agar / 75 μ g/ml Amp.

Pour l'amplification, 25 μ l ($\sim 2.4 \times 10^6 / 10^8$ ml) de solution stock de cellules DH5 α de la banque d'ADNc de cerveau humain sont dilués dans 12.2 ml de LB / 75 μ g/ml Amp. Cette suspension est étalée sur les 240 boîtes de Pétri à raison de 50 μ l par boîte. Après une croissance de 18 heures à 37°C, les cellules de chaque boîte sont suspendues dans 2 ml de LB / 100 μ g/ml Amp et réparties dans 2 erlens de 500 ml. Les cellules sont cultivées pendant 3 à 4 heures à 30°C sous agitation et la suspension est ajoutée à 125 ml de glycérol stérile pour obtenir une concentration finale de glycérol de 20%. Le milieu est centrifugé durant 15 minutes à 6000g à une température de 4°C et le culot cellulaire obtenu, utilisé pour purifier les plasmides dérivés de pGAD.

VIII-G-5 Purification des plasmides dérivés de pGAD de la banque d'ADNc de

cerveau humain

A partir du culot cellulaire, les plasmides dérivés de pGAD de la banque d'ADNc sont purifiés par lyse alcaline (Birnboim et Doly 1979) à l'aide d'un kit commercial de purification de plasmide (QIAfilter Plasmid Mega Kit - Qiagen) en suivant le protocole décrit par le fournisseur. La solution finale de plasmide (1 mg/ml) est dosée par spectrophotométrie (260 nm).

VIII-G-6 Transformation des levures

VIII-G-6-a Préparation des levures compétentes

Ce traitement décrit ci-dessous permet d'obtenir des cellules de levure hautement transformables (Ito *et coll.* 1983).

Une colonie isolée de levure à transformer (L40 ou L40 / pLex-X) est placée dans 10 ml de milieu de culture (respectivement YPD ou DO-Trp), durant une nuit à 30°C sous agitation (220 tpm). Les cellules sont comptées à l'aide d'un microscope et ajustées à une densité de 10^7 cellules/ml. Après environ 2 heures à 30°C sous agitation à 220 tpm correspondant à une génération, les cellules sont rendues compétentes. Ceci est équivalent à mesurer la densité optique à 600 nm, à l'ajuster à 0.2 par dilution dans le même milieu et à récolter les cellules quand elles atteignent une absorbance comprise entre 0.5 et 0.6 à 600 nm.

Les cellules sont récoltées par centrifugation 2 minutes à 1500g à 4°C et le culot rincé par 2.5 ml d'eau stérile. Après une nouvelle centrifugation (2 minutes à 1500g et 4°C), le culot est lavé par 0.1M d'acétate de lithium, centrifugé à nouveau et finalement suspendu dans 2.5 ml d'acétate de lithium 0.1M. Les cellules sont ensuite incubées 1 heure à 30°C sous agitation (220 tpm), centrifugées comme ci-dessus et le culot suspendu dans 0.5 ml d'acétate de lithium 0.1M.

VIII-G-6-b Transformation

Pour l'étape de transformation proprement dite, à 100 µl de suspension de cellules compétentes sont ajoutés 1 µl d'une solution d'ADN plasmidique à insérer (<5 µg), 4 µl d'une solution d'ADN de sperme de saumon dénaturé (Salmon Sperm DNA - Gibco) et 300 µl d'une solution de PEG 3350 à 50% stérilisée par filtration. L'ADN simple brin dénaturé joue le rôle de transporteur du plasmide et permet d'augmenter le rendement de transformation (Schiestl et Gietz 1989).

Le mélange est incubé 30 minutes à 30°C, puis 25 minutes à 42°C. Après centrifugation à 1000 g, le culot est rincé par 1 ml de milieu DO-I ou DO-III, selon qu'il s'agit respectivement d'une transformation par un plasmide dérivé de pLEX11 ou lors de la transformation par un plasmide dérivé de pGAD d'une souche L40 préalablement transformée par un plasmide dérivé de pLEX11. Après une nouvelle centrifugation, le culot est repris dans un minimum de milieu DO-I ou DO-III et, pour s'assurer de l'efficacité de transformation, la suspension est étalée soit sur DO-I/Agar dans le cas de la transformation d'une souche L40 par le plasmide dérivé de pLEX11, soit sur DO-II/Agar dans le cas d'une souche L40 contenant le plasmide dérivé de pLEX11 transformée par un plasmide dérivé de pGAD. Dans ce dernier cas, une partie de la suspension est aussi étalée sur DO-III/Agar et incubé à 30°C pour juger de l'interaction entre les protéines fusions.

VIII-G-7 Préparation des extraits cytosoliques de levure

Une colonie isolée L40/pLEX-T1 est utilisée pour inoculer 100 ml de DO-I, à une absorbance de 0.5 à 600 nm, le milieu de culture est centrifugé 2 minutes à 2000 g et le culot de cellules repris par un minimum d'eau stérile avant d'être disposé dans un tube taré. Après une centrifugation rapide (30 secondes, 12000 g), le culot est rincé par de l'eau stérile et de nouveau centrifugé. Le culot obtenu (160 mg) est suspendu dans 3 x 160 µl d'une solution de Tris 20 mM pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 5% Glycérol, 1 mM DTT, 1 mM PMSF (Tampon GBD). 640 mg de billes de verres (150 à 200 µm de diamètre) sont ajoutés et mélangés 7 fois 1 minute sur un agitateur à 4°C en respectant une pause de 2 minutes entre chaque agitation. Après une rapide centrifugation à 2000g, le surnageant est prélevé puis disposé dans un nouveau tube et les billes rincées par 2 x 160 µl de Tampon GBD. Après agitation et centrifugation, le surnageant est récupéré et disposé avec le précédent avant d'être

centrifugé une heure à 4°C et 12000 g. Le surnageant obtenu, correspondant à l'extrait cellulaire, est prélevé et les protéines dosées par la méthode de Bradford.

VIII-G-8 Détection de la protéine de fusion LexA-T1

Afin de détecter spécifiquement la protéine Lex-T1 dans l'extrait cellulaire de levure *Saccharomyces cerevisiae* L40/pLEX-T1, ce dernier est transféré sur membrane suivant le protocole décrit précédemment.

La membrane, contenant les protéines, peut être colorée avec une solution de bleu de Coomassie (Bleu de Coomassie-R250 0.08% / Méthanol 40%) et décoloré par une solution de 50% de méthanol / 10% d'acide acétique afin de révéler les bandes protéiques. Néanmoins dans le cas d'une révélation ultérieure des protéines par immunodétection, la membrane n'est pas colorée au bleu de Coomassie. En effet la présence de molécules de colorant au niveau des protéines peut inhiber la reconnaissance anticorps/antigène. Pour cela, une coloration à l'aide d'une solution de rouge Ponceau est effectuée pour s'assurer du transfert des protéines sur la membrane puis la membrane est décolorée à l'eau.

VIII-G-8-a Immunodétection

La membrane est rincée durant 1 heure dans 10 ml de tampon de blocage (T-TBS / 2% BSA) à température ambiante. 2 µl d'anticorps anti-LexA de souris (0.2µg/µl - Clontech, don du Dr M. Tardif, BBSI, DBMS, CEA Grenoble, France) (dilution finale 1/5000^e) sont ajoutés et l'incubation poursuivie durant 1 heure à température ambiante. La membrane est rincée 3x 15 minutes par 25 ml de tampon T-TBS puis incubée pendant 1 heure à température ambiante avec une dilution de 1/5000^e, dans un tampon T-TBS / 2% BSA, d'anticorps de mouton anti-immunoglobuline de souris couplé à la peroxydase de cheval (Amersham). Finalement la membrane est de nouveau rincée 3x 15 minutes par 25 ml de tampon T-TBS avant d'être révélée à l'aide d'un kit commercial (E.C.L. - Amersham) suivant le protocole décrit par le fournisseur. La révélation s'effectue par autoradiographie de la chimiluminescence induite par la dégradation du luminol par l'activité peroxydase portée par les anticorps secondaires.

VIII-G-9 Dosage de l'activité β -galactosidase avec le X-Gal

Les souches doublement transformées de *Saccharomyces cerevisiae* à analyser, sont déposées en trait sur un papier filtre stérile sans cendre (N°40 Whatman), disposé sur une boîte DO-III, et incubées une nuit à 30°C.

Dans une boîte de Pétri, un papier filtre stérile (N°3 Whatman) est imbibé du mélange suivant :

2.5 ml de Tampon Z (Na_2HPO_4 60 mM, NaH_2PO_4 40 mM, KCl 10 mM, MgSO_4 1 mM, stérile).

6.75 μl 2-ME (14M)

25 μl de 2% de X-Gal dans le DMF.

La lyse des cellules sur le papier Whatman N°40 s'effectue par immersion durant 20 secondes dans l'azote liquide et retour à température ambiante. Le filtre contenant les cellules lysées est déposé au contact du papier Whatman N°3 dans la boîte de Pétri pendant une nuit. La présence d'activité β -galactosidase se traduit par l'apparition d'une couleur bleue.

VIII-G-10 Purification des plasmides de levures

Les plasmides dérivés de pGAD contenus dans les levures doublement transformées sont purifiés pour être identifiés. Pour cela, chaque colonie se développant sur milieu DO-III (et présentant l'activité β -galactosidase sur une boîte indépendante) est prélevée et remise en suspension dans 50 μl de tampon TE stérile (10 mM Tris pH 7.4, 1 mM EDTA). 300 μg de billes de verre (150 à 200 μm de diamètre) sont ajoutés ainsi que 200 μl de tampon de lyse (Tris 10 mM pH 8.0, NaCl 0.1 M, EDTA 1 mM, SDS 1%, Triton X-100 2%) et 200 μl d'une solution de phénol / chloroforme / alcool isoamylique (25:24:1). La suspension est homogénéisée sur un agitateur durant deux minutes puis centrifugée durant 5 minutes à 12000g afin de séparer les deux phases. La phase aqueuse contenant le plasmide d'intérêt est transvasée dans un nouveau tube, précipitée à l'éthanol et le culot obtenu dissous dans 20 μl d'eau stérile.

VIII-G-11 Transformation d'*Escherichia coli* HB101

Afin d'analyser les plasmides pGAD avec insert, ceux-ci doivent être amplifiés car la quantité et la qualité obtenues à partir de levures ne sont pas suffisantes. Pour cela des bactéries *Escherichia coli* HB101 sont transformées par électroporation.

VIII-G-11-a Préparation des bactéries

Une colonie isolée d'*Escherichia coli* HB101 sur milieu LB / Agar contenant 50 µg/ml de streptomycine (Str) est utilisée pour inoculer 5 ml de LB / Str 50 µg/ml. Après une nuit de croissance à 37°C sous agitation à 250 tpm, 2.5 ml de cette pré-culture sont utilisés pour inoculer 500 ml de LB et placés à 37°C sous agitation à 220 tpm. Une fois la suspension de cellules ayant atteint une densité optique à 600 nm comprise entre 0.5 et 0.7, elle est placée dans la glace, avant d'être centrifugée à 4°C durant 20 minutes à 4000 g. Le surnageant est éliminé et le culot suspendu dans 500 ml d'eau stérile à 4°C. Après une nouvelle centrifugation le culot est lavé par 500 ml d'eau stérile à 4°C et, après une ultime centrifugation, le culot est suspendu dans un minimum d'eau stérile à 4°C et transféré dans un tube de centrifugation stérile en polypropylène (Falcon - 50 ml). La suspension est centrifugée 10 minutes à 4°C à 2000 g, le culot final de cellules repris dans un volume égal d'eau stérile à 4°C et la suspension conservée à 4°C avant l'électroporation.

VIII-G-11-b Transformation par électroporation

L'étape de transformation s'effectue à l'aide d'un électroporateur (E. coli Pulser™ - Biorad). Le principe consiste à appliquer très rapidement une très forte tension sur une solution de bactéries compétentes en présence d'une solution d'ADN plasmidique à insérer. Sous l'action de ce stress électromécanique, les bactéries deviennent poreuses vis à vis de certaines molécules comme l'ADN plasmidique.

1 µl de solution de plasmide (<5 µg) est placé à 4°C en présence de 50 µl de cellules HB101 compétentes. Le mélange est transvasé dans une cuvette d'électroporation (E. coli Pulser Cuvette™ - Biorad) préalablement refroidie à 4°C et l'électroporation s'effectue par l'application d'une tension de 2.48 KV (constante de temps moyenne de 5.6 ms). Aussitôt, 1 ml de LB stérile est ajouté à la suspension et le milieu transvasé dans un tube de culture pour

être incubé à 37°C durant 1 heure sous agitation à 200 tpm. Les cellules sont récoltées par centrifugation 10 minutes à 4000 g et le culot cellulaire rincé par 1 ml de milieu minimal. Après une nouvelle centrifugation (10 minutes, 4000 g), le culot est suspendu dans quelques µl de milieu minimum, étalé sur une boîte M9/Agar / 50 µg/ml Amp / 30 µg/ml Str et incubé à 37°C.

VIII-G-12 Purification des plasmides de HB101

Une colonie isolée d'une boîte M9/Agar / 50µg/ml Amp / 30 µg/ml Str est utilisée pour ensemençer 2.5 ml de TB / 100 µg/ml Amp / 30 µg/ml Str qui sont incubés une nuit à 37°C sous agitation (220 tpm). La purification du plasmide s'effectue alors par la méthode de lyse alcaline (Birnboim et Doly 1979) à l'aide d'un kit commercial (Easy Prep® Plasmid Prep Kit - Pharmacia).

VIII-H Expériences liées aux séparations par Electrophorèse Capillaire

VIII-H-1 Modification de la sonde

10 µl d'IRE synthétisé in vitro sans nucléotide radioactif (5µg/µl dans H₂O DEPC) sont incubés avec 10 µl d'Oregon Green 488 cadaverin (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) (10 mg/ml dans le DMSO) et 25 µl de tampon de liaison 2x (250 mM 1-methylimidazole pH 9.0 / 330 mM de [1-(3-Diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide] (EDAC) - Interchim). Le volume est ajusté à 50 µl par l'ajout d'eau traitée DEPC et la solution laissée une nuit à température ambiante sous une légère agitation. Le produit obtenu est concentré par précipitation à l'éthanol, le culot dissous dans 40 µl d'une solution dénaturante (80% formamide / 10 mM NaOH / 1 mM EDTA / 0.1% Bleu de bromophénol) et purifié sur un gel dénaturant de polyacrylamide (20% A/BA / 7 M Urée / 0.5X TBE). Une bande orangée visible est découpée, puis extraite suivant le protocole décrit précédemment pour la synthèse de sonde IRE (VIII-F-4-b), jusqu'à l'obtention de la solution d'Oregon-IRE dans l'eau traitée DEPC.

VIII-H-2 Séparation par électrophorèse capillaire

Les séparations sont réalisées sur un appareil d'électrophorèse capillaire (P/ACE System 5510 - Beckman), qui peut être équipé soit d'un détecteur UV-Visible à barrette de diodes, soit d'un détecteur de fluorescence induite par laser qui permet une excitation à une longueur d'onde de 488 nm.

Les capillaires de silice utilisés (eCap Capillary et eCAP Neutral Capillary - 50 μ m de diamètre interne - Beckman), d'une longueur de 57 cm (50 cm jusqu'à la fenêtre de détection), sont montés suivant les instructions décrites par le fournisseur dans les cartouches de réfrigération correspondantes au mode de détection et l'appareil entièrement contrôlé via le logiciel GOLD (version 8.10 - Beckman).

Les différentes solutions à analyser sont séparées selon le même protocole, à savoir : Avant injection, le capillaire est rincé et rempli de tampon de séparation (10 mM HEPES pH 7.6, 3 mM MgSO_4 , 40 mM KCl, en eau traitée DEPC) par injection à haute pression durant 4 minutes. L'injection de l'échantillon à analyser est réalisée à basse pression durant quelques secondes. Puis la séparation a lieu en appliquant une tension élevée (20-30 KV) entre les deux cuves de tampon de séparation durant plusieurs minutes et les données relatives à l'intensité de fluorescence et à l'intensité du courant sont enregistrées. Après la séparation, un premier lavage du capillaire est réalisé par le passage à haute pression d'une solution de soude 0.1 M durant 4 minutes, puis d'un second lavage, toujours à haute pression durant 4 minutes, par de l'eau traitée DEPC.

VIII-I Méthodes structurales

VIII-I-1 Préparation des échantillons de diffusion des neutrons

Des solutions à 5 mg/ml de protéine rhIRP1, soit sous la forme aconitase, soit sous la forme fixatrice du motif IRE, sont préparées et plusieurs concentrations d'eau lourde sont utilisées. Les échantillons préparés en présence d'eau lourde sont dialysés, en boîte à gants, à l'aide d'un système de microdialyse (System 100 MicroDialyser - Pierce), durant une nuit contre leur tampon respectif afin de réaliser l'échange H/D. Le tampon utilisé sert aussi de référence pour les expériences de diffusion des neutrons.

Les deux formes de la protéine sont préparées soit dans 20 mM Tris-Cl pH 7.4 / 1 mM DTT sans D₂O, soit 20 mM Tris-Cl pH 7.4 / 1 mM DTT contenant 65% de D₂O. Le DTT est utilisé pour éviter l'oxydation des cystéines de la forme fixatrice du motif IRE. La deutération complète est obtenue par dialyse contre 20 mM de phosphate de potassium pH 7.4 / 1 mM DTT en D₂O. Les mêmes traitements sont appliqués au mélange contenant à la fois la forme fixatrice d'IRE (5mg/ml) et le motif IRE à une stœchiométrie de [1:1], afin d'étudier d'éventuelles modifications structurales lors de la fixation du motif d'ARN.

Avant l'étude, les échantillons sont centrifugés à 125000g (Airfuge - Beckman) pour éliminer les agrégats et obtenir une solution monodisperse. Ils sont transvasés dans des cuves de quartz (Hellma) de chemin optique 1 mm pour les solutions sans D₂O et 2 mm pour les concentrations 65 et 100% de D₂O. La concentration exacte en eau lourde de chaque solution est mesurée par transmission et comparée à la transmission du tampon correspondant. Tout écart est corrigé puisque l'intensité diffusée dépend du contraste.

VIII-I-2 Diffusion des neutrons

Les données de diffusion des neutrons sont acquises sur les lignes D11 et D22 du réacteur de l'Institut Laue Langevin (ILL) par le Dr Peter Timmins (Large Scale Structures Group, ILL, Grenoble, France). Les données sont traitées grâce aux différents programmes d'analyse développés à l'ILL.

VIII-I-3 Dichroïsme circulaire

Les spectres sont acquis sur un spectropolarimètre (J-810, JASCO), sous un balayage d'azote afin de diminuer la contribution de l'absorption de la lumière par l'oxygène aux faibles longueurs d'ondes. Ceci a rendu nos spectres exploitables jusqu'à 185 nm.

Les spectres sont enregistrés à 21°C entre 320 et 180 nm, à 20 nm/min avec une constante de temps de 2 secondes sur une fenêtre de 4 nm et les spectres représentés correspondent à la moyenne de 10 spectres accumulés.

VIII-J Autres Matériels et Méthodes

VIII-J-1 Spectroscopie UV-Visible

Les différents spectres d'absorption, ainsi que les données cinétiques nécessaires à la mesure de l'activité aconitase, sont enregistrés sur des spectrophotomètres à barrettes de diodes (Hewlett Packard 8452 ou 8453).

VIII-J-2 Spectroscopie de fluorescence

Les différents spectres de fluorescence sont obtenus avec un spectrofluorimètre (Spex - FluoroMax) dans une cuve en quartz de 3 mm de chemin optique (Hellma).

VIII-J-3 Spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE)

Les spectres sont enregistrés sur un spectromètre Brücker en bande X (9 GHz), équipé d'un système de transfert d'hélium liquide (Oxford Instruments), par le Dr J. Gaillard (SCPM, DRFMC, CEA Grenoble, France).

VIII-J-4 Spectrométrie de masse

VIII-J-4-a Préparation des échantillons

Les solutions de 10 μ M de rhIRP1 sont dessalées par dilutions et concentrations successives dans 20 mM d'acétate d'ammonium pH 7.5 sur une membrane d'ultrafiltration (Microcon YM30, Amicon, Millipore) par centrifugation à 7000 g, à 4°C, durant 8 minutes.

VIII-J-4-b Conditions d'acquisition des données

Les spectres de masses sont enregistrés sur un spectromètre tandem à secteurs magnétiques (ZABSPEC T, Micromass, Manchester, UK) sur lequel est monté une source d'ionisation par électro-nébulisation (Griffiths *et coll.* 2001). Les échantillons sont introduits dans la source par un flux continu de 5 μ l/min à l'aide d'un injecteur automatique (Harvard apparatus model 11). La nébulisation est obtenue en appliquant un voltage de 8 KV au niveau

du capillaire et les ions obtenus accélérés par l'application d'un potentiel de 4 KV en sortie de capillaire. Le capillaire est chauffé à 80°C et un flux d'azote est utilisé pour faciliter la désolvatation de l'échantillon. Les spectres sont enregistrés sur une fenêtre spectrale fixée entre 500 et 9000 m/z, avec un taux de rafraîchissement de 10 secondes/décade, après que l'appareil ait été préalablement calibré à l'aide d'une solution d'iodure de césium.

VIII-J-5 Synthèse de doxorubicinol

Le doxorubicinol, métabolite de la doxorubicine, est généré par réduction chimique de son précurseur. Pour cela, 200 µl de 20 mM de doxorubicine dans 50 mM HEPES pH 7.6 sont incubés avec 2 équivalents de borohydrure de potassium (KBH_4) durant 2 heures à température ambiante. La couleur initiale, d'un rouge profond vire rapidement au noir. La solution est ensuite extraite par 300 µl de chloroforme afin d'éliminer les dérivés aglycones générés, puisque ceux-ci, hydrophobes, sont solubles dans ce solvant (Takanashi et Bachur 1976). Le produit est ensuite purifié par chromatographie liquide haute performance (Kontron) sur une colonne de polarité de phase inverse C18 (Dr Knauer) de 9x250mm, en flux isocratique (30% Acétonitrile / 0.1% H_3PO_4). Les produits élués sont détectés en ligne à l'aide d'un spectrofluorimètre Bio-Tek SFM25 à une longueur d'onde d'excitation de 470 nm et une longueur d'onde d'émission de 585 nm.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

----- A -----

Abboud S. and Haile D.J. (2000)

A Novel Mammalian Iron-Regulated Protein Involved in Intracellular Iron Metabolism.

J. Biol. Chem., **275**, 19906-19912

Adams J., Kelso R. and Cooley L. (2000)

The Kelch Repeat Superfamily of proteins : propellers of cell function.

Trends Cell Biol., **10**, 17-24

Address K.J., Basilion J.P., Klausner R.D., Rouault T.A. and Pardi A. (1997)

Structure and Dynamics of the Iron responsive Element RNA : Implications for Binding of the RNA by Iron Regulatory Binding Proteins.

J. Mol. Biol., **274**, 72-83

Altschul S.F., Stephen F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. and Lipman D.J. (1997)

Gapped BLAST and PSI-BLAST : A New Generation of Protein Database Search Programs.

Nucleic Acids Res., **25**, 3389-3402

Andrews N.C. (1999)

The Iron Transporter DMT1

Intl. J. Biochem. Cell Biol., **31**, 991-994

Andriollo M., Guiraud P. and Favier A. (1999)

Comparaison de l'Etat Redox des Cellules Tumorales GLC4 Sensibles et Résistantes à l'Adriamycine.

L'Eurobiologiste, Tome XXXVIII, N° 244, 339 - 344

Atta M., Lafferty M.E., Johnson M.K., Gaillard J. and Meyer J. (1998)

Heterologous Biosynthesis and Characterization of the [2Fe-2S]-Containing N-terminal Domain of *Clostridium Pasteurianum* Hydrogenase.

Biochemistry, **37**, 15974-15980

Askwith C.C., de Silva D. and Kaplan J. (1996)

Molecular Biology of Iron Acquisition in *Saccharomyces Cerevisiae*.

Mol. Microbiol., **20**, 27-34

Aziz N. and Munro H.N. (1987)

Iron Regulates Ferritin mRNA Translation Through a Segment of its 5' Untranslated Region.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **84**, 8478-8482

----- B -----

Babbs C.F and Steiner M.G. (1990)

Detection and Quantitation of Hydroxyl Radical Using Dimethyl Sulfoxide as Molecular Probe.

Methods. Enzymol., **186**, 137-147

Babior B.M. (1999)

NADPH Oxidase : An Update.

Blood, **93**, 1464-1476

Balla G., Jacob H.S., Balla J., Rosenberg M., Nath K., Apple F., Eaton J.W. and Vercellotti G.M. (1992)

Ferritin: A Cytoprotective Antioxidant Stratagem of Endothelium.

J. Biol. Chem., **267**, 18148-18153

Bardwell V.J. and Treisman R. (1994)

The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif.

Genes Dev., **8**, 1664-1677

Basilion J.P., Kennedy M.C., Beinert H., Massinople C.M., Klausner R.D. and Rouault T.A. (1994a)

Overexpression of Iron-Responsive Element-Binding Protein and Its Analytical Characterization as the RNA-Binding Form, Devoid of an Iron-Sulfur Cluster.

Arch. Biochem. Biophys., **311**, 517-522

- Basilion J.P., Rouault T.A., Massinople C.M., Klausner R.D. and Burgess W.H. (1994b)
The Iron-Responsive Element-Binding Protein : Localization of the RNA-Binding Site to the Aconitase Active-Site Cleft.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**, 574-578
- Beard J.L., Dawson H. and Piñero D.J. (1996)
Iron Metabolism : A Comprehensive Review.
Nutr. Rev., **54**, 295-317
- Beggs A.H., Byers T.J., Knoll J.H.M., Boyce F.M., Bruns G.A.P. and Kunkel L.M. (1992)
Cloning and Characterization of Two Human Skeletal Muscle α -Actinin Genes Located on Chromosomes 1 and 11.
J. Biol. Chem., **267**, 9281-9288
- Beinert H. and Thomson A.J. (1983)
Three-Iron Clusters in Iron-Sulfur Proteins.
Arch. Biochem. Biophys., **222**, 333-361
- Beinert H., Kennedy M.C. and Stout C.D. (1996)
Aconitase as Iron-Sulfur Protein, Enzyme, and Iron-Regulatory Protein.
Chem. Rev., **96**, 2335-2373
- Beinert H., Holm R.H. and Münck E. (1997)
Iron-Sulfur Clusters : Nature's Modular, Multipurpose Structures.
Science, **277**, 653-659
- Bennet M.J., Lebrón J.A. and Bjorkman P.J. (2000)
Crystal Structure of the Hereditary Haemochromatosis Protein HFE Complexed with Transferrin Receptor.
Nature, **403**, 46-53
- Berlett B.S. and Stadtman E.R. (1997)
Protein Oxidation in Aging, Disease and Oxidative Stress.
J. Biol. Chem., **272**, 20313-20316

Bettany A.J.E., Eisenstein R.S. and Munro H.N. (1992)

Mutagenesis of the Iron-Regulatory Element Further Defines a Role for RNA Secondary Structure in the Regulation of Ferritin and Transferrin Receptor Expression.

J. Biol. Chem., **267**, 16531-16537

Birnboim H.C. and Doly J. (1979)

A Rapid Alkaline Extraction Method for Screening Recombinant Plasmid DNA.

Nucl Acids Res., **7**, 1513--1523

Bouton C., Raveau M. and Drapier J-C. (1996)

Modulation of Iron Regulatory Protein Functions. Further insights into the Role of Nitrogen- and Oxygen-Derived Reactive Species.

J. Biol. Chem., **271**, 2300-2306

Bouton C., Hirling H. and Drapier J-C. (1997)

Redox Modulation of Iron Regulatory Proteins by Peroxynitrite.

J. Biol. Chem., **272**, 19969-19975

Bouton C., Oliveira L. and Drapier J-C. (1998)

Converse Modulation of IRP1 and IRP2 by Immunological Stimuli in Murine RAW 264.7 Macrophages.

J. Biol. Chem., **273**, 9403-9408

Bouton C. (1999)

Nitrosative and Oxidative Modulation of Iron Regulatory Proteins.

Cell. Mol. Life Sci., **55**, 1043-1053

Boveris A. and Chance B. (1973)

The Mitochondrial Generation of Hydrogen Peroxide. General Properties and Effect of Hyperbaric Oxygen.

Biochem. J., **134**, 707-716

Boyer R.F., Grabill T.W. and Petrovich R.M. (1988)

Reductive Release of Ferritin Iron: A Kinetic Assay.

Anal. Biochem., **174**, 17-22

Bradford M. (1976)

A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.

Anal. Biochem., **72**, 248-254

Braun V. and Killmann H. (1999)

Bacterial Solutions to the Iron-Supply Problem.

Trends Biochem. Sci., **24**, 104-109

Butt J., Hae-Yeong K., Basilion J.P., Cohen S., Iwai K., Philpott C.C., Atlschul S., Klausner R.D. and Rouault T.A. (1996)

Differences in the RNA Binding Sites of Iron Regulatory Proteins and Potential Target Diversity.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **93**, 4345-4349

Byron O. and Gilbert R.J.C. (2000)

Neutron Scattering : Good News for Biotechnology.

Curr Op. Biotech., **11**, 72-80

----- C -----

Cairo G. and Pietrangelo A. (1994)

Transferrin Receptor Gene Expression During Rat Liver Regeneration. Evidence for Post-Transcriptional Regulation by Iron Regulatory Factor_B, a Second Iron-Responsive Element-Binding Protein.

J. Biol. Chem., **269**, 6405-6409

Cairo G., Gastrusini E., Minotti G. and Bernelli-Zazerra A. (1996)

Superoxide and Hydrogen Peroxide-Dependent Inhibition of Iron Regulatory Protein Activity : A Protective Stratagem Against Oxidative Injury.

FASEB J., **10**, 1326-1335

Canonne-Hergaux F., Gruenheid S., Ponka P. and Gros P. (1999)

Cellular and Subcellular Localization of the Nramp2 Iron Transporter in the intestinal Brush Border and regulation by Dietary Iron.

Blood, **93**, 4406-4417

Casey J.L., Hentze M.W., Koeller D.M., Caughman S.W., Rouault T.A., Klausner R.D. and Harford J.B. (1988)

Iron-Responsive Elements : Regulatory RNA Sequences That Control mRNA Levels and Translation.
Science, **240**, 924-928

Casey J.L., Koeller D.M., Ramin V.C., Klausner R.D. and Harford J.B. (1989)

Iron Regulation of Transferrin Receptor mRNA Levels Requires Iron-Responsive Elements and a Rapid Turnover Determinant in the 3' Untranslated Region of the mRNA.
EMBO J., **8**, 3693-3699

Chatelet C., Gaillard J. Pétillet Y., Louwagie M. and Meyer J. (1999)

A [2Fe-2S] Protein from the Hyperthermophilic Bacterium *Aquifex Aeolicus*.
Biochem. Biophys. Res. Commun., **261**, 885-889

Chénais B., Andriollo M., Guiraud P., Belhoussine R. and Jeannesson P. (2000)

Oxidative Stress Involvement in Chemically Induced Differentiation of K562 Cells.
Free Rad. Biol. Med., **28**, 18-27

Chitambar C.R. and Wereley J.P. (1997)

Resistance to the Antitumor Agent Gallium Nitrate in Human Leukemic Cells Is Associated with Decreased Gallium/Iron Uptake, Increased Activity of Iron Regulatory Protein-1, and Decreased Ferritin Production.
J. Biol. Chem., **272**, 12151-12157

Ciechanover A. (1994)

The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway.
Cell, **79**, 13-21

Cohen P., Holmes C.F.B. and Tsukitani Y. (1990)

Okadaic Acid : A New Probe for the Study of Cellular Regulation.
Trends Biochem. Sci., **15**, 98-102

Constable A., Quick S., Gray N.K. and Hentze M.W. (1992)

Modulation of the RNA-Binding Activity of a Regulatory Protein by Iron *in vitro*: Switching Between Enzymatic and Genetic Function ?
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **89**, 4554-4558

Cox T.C., Bawden M.J., Martin A. and May B.K. (1991)

Human Erythroid 5-Aminolevulinate Synthase : Promoter Analysis and Identification of an Iron-Responsive Element in the mRNA.

EMBO J., **10**, 1891-1902

----- D -----

Dandekar T., Stripecke R., Gray N.K., Goosen B., Constable A., Johansson H.E. and Hentze M.W. (1991)

Identification of a Novel Iron-Responsive Element in Murine and Human Erythroid δ -Aminolevulinic Acid Synthase mRNA.

EMBO J., **10**, 1903-1909

Dauter Z., Wilson K.S., Sieker L.C., Meyer J. and Moulis J-M. (1997)

Atomic Resolution (0.94 Å) Structure of *Clostridium Acidurici* Ferredoxin. Detailed Geometry of [4Fe-4S] Clusters in a Protein.

Biochemistry, **36**, 16065-16073

Davasse V. and Moulis J-M. (1992)

Design and Functional Expression in *Escherichia Coli* of a Synthetic Gene Encoding *Clostridium Pasteurianum* 2[4Fe-4S] ferredoxin.

Biochem. Biophys. Res. Commun., **185**, 341-349

Dean D.R., Bolin J.T. and Zheng L. (1993)

Nitrogenase Metailloclusters : Structures, Organization, and Synthesis.

J. Bacteriol., **175**, 6737-6744

de Bruijn P., Verweij J., Loos W.J., Kolker H.J., Planting A.S.T., Nooter K., Stoter G. and Sparreboom A. (1999)

Determination of Doxorubicin and Doxorubicinol in Plasma of cancer Patients by High-Performance Liquid Chromatography.

Anal. Biochem., **266**, 216-221.

Donovan A., Brownlie A., Zhou Y., Shepard J., Pratt S.J., Moynihan J., Paw B.H., Drejer A., Barut B., Zapata A., Law T.C., Brugnara C., Lux S.E., Pinkus G.S., Pinkus J.L., Kingsley P.D., Palis J., Fleming M.D., Andrews N.C. and Zon L.I. (2000)

Positional Cloning of Zebrafish ferroportin1 Identifies a Conserved Vertebrate Iron Exporter.

Nature, **403**, 776-781

Drapier J-C., Hirling H., Wietzerbin J., Kaldy P. and Kühn L.C. (1993)

Biosynthesis of Nitric Oxide Activates Iron Regulatory Factor in Macrophages.

EMBO J., **12**, 3643-3649

----- E -----

Eide D.J. (1998)

The Molecular Biology of metal Ion Transport in *Saccharomyces Cerevisiae*.

Annu. Rev. Nutr., **18**, 441-469

Eisenstein R.S., Tuazon P.T., Schalinske K.L., Anderson S.A. and Traugh J.A. (1993)

Iron-Responsive Element-Binding Protein. Phosphorylation by Protein Kinase C.

J. Biol. Chem., **268**, 27363-27370

Eisenstein R.S., Barton H.A., Pettingell, Jr. W.H. and Bomford A.B. (1997)

Isolation, Characterization and Functional Studies of Rat Liver Iron regulatory Protein 1.

Arch. Biochem. Biophys., **343**, 81-91

Eisenstein R.S. (2000a)

Discovery of the ceruloplasmin homologue hephaestin: new insight into the copper/iron connection.

Nutr. Rev., **58**, 22-26

Eisenstein R.S. (2000b)

Iron Regulatory Proteins and the Molecular Control of Mammalian Iron Metabolism.

Annu. Rev. Nutr., **20**, 627-662

Emery-Goodman A., Hirling H., Scarpellino L., Henderson B. and Kühn L.C. (1993)

Iron Regulatory Factor Expressed From Recombinant Baculovirus: Conversion Between the RNA-Binding Apoprotein and Fe-S Cluster Containing Aconitase.

Nucleic Acids Res., **21**, 1457-1461

----- F -----

Feder J.N., Gnirke A., Thomas W., Tsuchihashi Z., Ruddy D.A., Basava A., Dormishian F., Domingo A. Jr, Ellis M.C., Fullan A., Hinton L.M., Jones N.L., Kimmel B.E., Kronmal G.S., Lauer P., Lee V.K., Loeb D.B., Mapa F.A., McClelland E., Meyer N.C., Mintier G.A., Moeller N., Moore T., Morikang E., Prass C.E., Quintana L., Starnes S.M., Schatzman R.C., Brunke K.J., Drayna D.T., Risch N.J., Bacon B.R. and Wolff R.K.

A Novel MHC Class I-Like Gene is Mutated in Patients with Hereditary Haemochromatosis.

Nature Genet., **13**, 399-408

Feder J.N., Tsuchihashi Z., Irrinki A., Lee V.K., Mapa F.A., Morikang E., Prass C.E., Starnes S.M., Wolff R.K., Parkkila S, Sly W.S. and Schatzman R.C (1997)

The Hemochromatosis Founder Mutation in HLA-H Disrupts β_2 -Microglobulin Interaction and Cell Surface Expression.

J. Biol. Chem., **272**, 14025-14028

Feeney G.P. and Worwood M. (2001)

The Effects of Wild-Type and Mutant HFE Expression Upon Cellular Iron Uptake in Transfected Human Embryonic Kidney Cells.

Biochim. Biophys. Acta, **1538**, 242-251

Festa M, Colonna A, Pietropaolo C and Ruffo A. (2000)

Oxalomalate, A Competitive Inhibitor of Aconitase, Modulates the RNABinding Activity of Iron-Regulatory Proteins.

Biochem. J., **348**, 315-320

Fields S. and Song O-K. (1989)

A novel genetic system to detect protein-protein interactions.

Nature, **340**, 245-246

Finkel T. (1998)

Oxygen radicals and signaling.

Curr. Opin. Cell. Biol., **10**, 248-253

Fleming M.D, Trenor C.C., Su M.A., Foernzler D., Beier D.R., Dietrich W.F. and Andrews N.C. (1997)

Microcytic Anaemia Mice have a Mutation in *Nramp2*, a Candidate Iron Transporter Gene.
Nature Genetics, **16**, 383-386

Flint D.H., Tuminello J.F. and Emptage M.H. (1993)

The inactivation of Fe-S Cluster Containing Hydro-lyases by Superoxide.
J. Biol. Chem., **268**, 22369-22376

Fréjaville C., Karoui H., Tuccio B., Le Moigne F., Culcasi M., Pietri S., Lauricella R. and Tordo P. (1995)

5-(Diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline *N*-Oxide: A New Efficient Phosphorylated Notrione for the *in Vitro* and *in Vivo* Spin Trapping of Oxygen-Centered Radicals.
J. Med. Chem., **38**, 258-265

Frishman D. and Hentze M.W. (1996)

Conservation of aconitase residues revealed by multiple sequence analysis. Implications of Structure/Function Relationships.
Eur. J. Biochem., **239**, 197-200

Fujinaga J. and Meyer J. (1993)

Cloning and Expression in *Escherichia Coli* of the Gene Encoding the [2Fe-2S] Ferredoxin from *Clostridium Pasterianum*.
Biochem. Biophys. Res. Commun., **192**, 1115-1122

----- G -----

Gegout V., Schlegl J., Schläger B., Hentze M.W., Reinbolt J., Ehresmann B., Ehresmann C. and Romby P. (1999)

Ligand-induced Structural Alterations in Human Iron Regulatory Protein-1 Revealed by Protein Footprinting.
J. Biol. Chem., **274**, 15052-15058

Gewirth D.A. (1999)

A critical evaluation of the mechanism of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics Adriamycin and daunorubicin.
Biochem. Pharmacol., **57**, 727-741

Giordani A., Morlière P., Djavaheiri-Mergny M. and Santus R. (1998)

Ultraviolet-A-Dependent Inhibition of Cytoplasmic Aconitase Activity of Iron Regulatory Protein-1 in NCTC 2544 Keratinocytes.

Photochem. Photobiol., **68**, 309-313

Giordani A., Martin M-E., Beaumont C., Santus R. and Morlière P.

Inactivation of Iron Responsive Element-Binding Capacity and Aconitase Function of Iron Regulatory Protein-1 of Skin Cells by Ultraviolet A.

Photochem. Photobiol., **72**, 746-752

Gower J.D., Healing G. and Green C.J. (1989)

Determination of Desferrioxamine-Available Iron in Biological Tissues by High-Pressure Liquid Chromatography.

Anal. Biochem., **180**, 126-130

Gray N.K., Quick S., Goosen B., Constable A., Hirling H., Kühn L.C. and Hentze M.W. (1993)

Recombinant Iron-Regulatory Factor Functions as an Iron-Responsive-Element-Binding-Protein, a Translational Repressor and an Aconitase. A Functional Assay for Translational repression and Direct Demonstration of the Iron Switch.

Eur. J. Biochem., **218**, 657-667

Greenfield N.J. (1997)

Methods to Estimate the Conformation of Proteins and Polypeptides from Dichroism Data.

Anal. Biochem., **235**, 1-10

Griffiths W.J., Jonsson A.P., Liu S, Rai D.K. and Wang Y. (2001)

Electrospray and Tandem Mass Spectrometry in Biochemistry.

Biochem. J., **355**, 545-561

Gunshin H., Mackenzie B., Berger U.V., Gunshin Y., Romero M.F., Boron W.F., Nussberger S., Gollan J.L. and Hediger M.A. (1997)

Cloning and Characterization of a Mammalian Proton-Coupled Metal-Ion Transporter.

Nature, **388**, 482-488

Guo B., Yu Y. and Leibold E.A (1994)

Iron Regulates Cytoplasmic Levels of a Novel Iron-Responsive Element-Binding Protein without Aconitase Activity.

J. Biol. Chem., **269**, 24252-24260

Guo B., Phillips J.D. and Leibold E.A. (1995)

Iron Regulates the Intracellular Degradation of Iron Regulatory Protein 2 by the Proteasome.

J. Biol. Chem., **270**, 21645-21651

Gutierrez J.A., Yu J., Rivera S. and Wessling-Resnick M. (1997)

Functional Expression, Cloning and Characterization of SFT, a Stimulator of Fe Transport.

J. Cell. Biol., **139**, 895-905

----- H -----

Haile D.J., Hentze M.W., Rouault T.A., Harford J.B. and Klausner R.D. (1989)

Regulation of Interaction of the Iron-Responsive Element Binding Protein with Iron-Responsive RNA Element.

Mol. Cell. Biol., **9**, 5055-5061

Haile D.J., Rouault T.A., Tang C.K., Chin J., Harford J.B. and Klausner R.D. (1992a)

Reciprocal Control of RNA-Binding and Aconitase Activity in the Regulation of the Iron-Responsive Element Binding Protein : Role of the Iron-Sulfur Cluster.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **89**, 7536-7540

Haile D.J., Rouault T.A., Harford J.B., Kennedy M.C., Blondin G.A., Beinert H., and Klausner R.D. (1992b)

Cellular Regulation of the Iron-Responsive Element Binding Protein: Disassembly of the Cubane Iron-Sulfur Cluster Results in High-Affinity RNA Binding

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **89**, 11735-11739

Halliwell B.E. and Gutteridge J.M.C. (1999)

Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed., Oxford University Press, New York.

Hantke K. (2001)

Iron and Metal Regulation in Bacteria.

Curr. Opinion Microbiol., **4**, 172-177

Harada K. and Frankel A.D. (1995)

Identification of two novel arginine binding DNAs

EMBO J., **14**, 5798-58

Harrell C.M., McKenzie A.R., Patino M.M., Walden W.E. and Theil E.C. (1991)

Ferritin mRNA : Interactions of Iron Regulatory Element with Translational Regulator Protein P-90 and the Effect on Base-Paired Flanking Regions.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **88**, 4166-4170

Harrison P.M and Arosio P. (1996)

The Ferritins : Molecular Properties, Iron Storage Function and Cellular Regulation.

Biochim. Biophys. Acta, **1275**, 161-203

Harrison P.M., Hempstead P.D., Artymiuk P.J. and Andrews S.C. (1998)

Structure-Function Relationships in the Ferritins.

Met. Ions Biol. Syst., **35**, 435-477

Heiger D.N. (1992)

High Performance Capillary Electrophoreses - An Introduction.

Hewlett-Packard Company. Publication N° 12-5091-6199E

Henderson B.R., Menotti E. and Kühn L.C. (1996)

Iron Regulatory Proteins 1 and 2 Bind Distinct Sets of RNA Target Sequences.

J. Biol. Chem., **271**, 4900-4908

Hentze M.W., Caughman S.W., Rouault T.A., Barriocanal J.G., Dancis A., Harford J.B. and Klausner R.D. (1987)

Identification of the Iron-Responsive Element for the Translational Regulation of Human Ferritin mRNA.

Science, **238**, 1570-1573

Hentze M.W., Rouault T.A., Harford J.B. and Klausner R.D. (1989)

Oxidation-Reduction and the Molecular Mechanism of a regulatory RNA-Protein Interaction.

Science, **244**, 357-359

Hentze M.W. and Kühn L.C. (1996)

Molecular Control of Vertebrate Iron Metabolism : mRNA-Based Regulatory Circuits Operated by Iron, Nitric Oxide and Oxidative Stress.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **93**, 8175-8182

Hirling H., Emery-Goodman A., Thompson N., Neupert B., Seiser C. and Kühn LC. (1992)

Expression of Active Iron Regulatory Factor from a Full-Length Human cDNA by *in vitro* Transcription/Translation.

Nucl. Acids. Res., **20**, 33-39.

Hirling H., Henderson B.R. and Kühn L.C. (1994)

Mutational analysis of the [4Fe-4S]-cluster converting iron regulatory factor from its RNA-binding form to cytoplasmic aconitase.

EMBO J., **13**, 453-461

Holm R.H., Kennepohl P. and Solomon E.I. (1996)

Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology

Chem. Rev., **96**, 2239-2314

Hong J.S. and Rabinowitz J.C. (1967)

Preparation and Properties of Clostridial Apoferredoxins.

Biochem. Biophys. Res. Commun., **29**, 246-252

Hu J. and Connor J.R. (1996)

Demonstration and Characterization of the Iron Regulatory Protein in Human Brain.

J Neurochem., **67**, 838-844

Hu J.C., Kornacker M.G. and Hochschild A. (2000)

Escherichia coli One- and Two-Hybride Systems for the Analysis and Identification of Protein-Protein Interactions.

Methods, **20**, 80-94

----- I -----

Ito H., Fukuda Y., Murata K. and Kimura A. (1983)

Transformation of Intact Yeast Cells Treated with Alkali Cations.

J. Bact., **153**, 163-168

Iwai K., Klausner R.D. and Rouault T.A. (1995)

Requirements for Iron-Regulated Degradation of the RNA Binding Protein, Iron Regulatory Protein 2.

EMBO J., **14**, 5350-5357

Iwai K., Drake S.K., Wehr N.B., Weissman A.M., LaVaute T., Minato N., Klausner R.D., Levine R.L. and Rouault T.A. (1998)

Iron-Dependent Oxidation, Ubiquitination, and Degradation of Iron Regulatory protein 2 : Implication for Degradation of Oxidized Proteins.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **95**, 4924-4928

----- J -----

Jacrot B. (1976)

The Study of Biological Structures by Neutron Scattering from Solution.

Rep. Prog. Phys., **39**, 911-953

Jorgenson J.W. and Lukacs K.D. (1981)

Zone Electrophoresis

----- K -----

Kaldy P., Menotti E, Moret R. and Kühn L. (1999)

Identification of RNA-Binding Surfaces in Iron Regulatory Protein-1.

EMBO J., **18**, 6073-6083

Karlin K.D. (1993)

Metalloenzymes, Structural Motifs and Inorganic Models

Science, **261**, 701-708

Ke Y., Wu J., Leibold E.A., Walden W.E. and Theil. E.C. (1998)

Loops and Bulge/Loops in Iron-Responsive Element Isoforms Influence Iron Regulatory Protein Binding. Fine-Tuning of mRNA Regulation?

J. Biol. Chem., **273**, 23637-23640

Kelly S.M. and Price N.C. (1997)

The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding.

Biochim. Biophys. Acta, **1338**, 161-185

Kennedy M.C., Emptage M.H., Dreyer J-L. and Beinert H. (1983)

The Role of Iron in the Activation-Inactivation of Aconitase.

J. Biol. Chem., **258**, 11098-11105

Kennedy M.C., Mende-Mueller L., Blondin G.A. and Beinert H. (1992)

Purification and Characterization of Cytosolic Aconitase from Beef Liver and Its Relationship to the Iron-Responsive Element Binding Protein.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**, 11730-11734

Kennedy M.C., Antholine W.E. and Beinert H. (1997)

An EPR Investigation of the Products of the Reaction of Cytosolic and Mitochondrial Aconitases with Nitric Oxide.

J. Biol. Chem., **272**, 20340-20347

Kiley P.J. and Beinert H. (1999)

Oxygen Sensing by the Global Regulator, FNR : The Role of the Iron-Sulfur Cluster.

FEMS Microbiol. Rev., **22**, 341-352

Kim S. and Ponka P. (1999)

Control of Transferrin Receptor Expression via Nitric Oxide-Mediated Modulation of Iron-Regulatory Protein 2.

J. Biol. Chem., **274**, 33035-33042

Kohler S., Henderson B.R. and Kühn L.C. (1995)

Succinate Dehydrogenase b mRNA of *Drosophila melanogaster* Has a Functional Iron-responsive Element in Its 5'-Untranslated Region.

J. Biol. Chem., **270**, 30781-30786

Konishi H., Tanaka M., Takemura Y., Matsuzaki H., Ono Y., Kikkawa U. and Nishizuka Y. (1997)

Activation of Protein Kinase C by Tyrosine Phosphorylation in Response to H₂O₂.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **93**, 11233-11237

Kotamraju S., Konorev E. A., Joseph J. and Kalyanaraman B. (2000)

Doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and cardiomyocytes ameliorated by nitron spin traps and ebselen.

J. Biol. Chem., **275**, 33585-33592

Kyritsis P., Hatzfeld O.M., Link T.A., Moulis J-M. (1998)

The Two [4Fe-4S] Clusters in *Chromatium Vinosum* Ferredoxin Have Largely Different Reduction Potentials. Structural Origin and Functional Consequences.

J Biol Chem., **273**, 15404-15411

----- L -----

Land T. and Rouault T.A. (1998)

Targeting of a Human Iron-Sulfur Cluster Assembly Enzyme, *nifs*, to Different Subcellular Compartments is Regulated through Alternative AUG Utilization.

Mol. Cell, **2**, 807-815

Lange H., Lisowsky T., gerber J., Mühlenthoff U., Kispal G. and Lill R. (2001)

An Essential Function of the Mitochondrial Sulfhydryl Oxidase Erv1p/ALR in the Maturation of Cytosolic Fe/S Proteins.

EMBO Rep., **8**, 715-720

Lauble H., Kennedy M.C., Beinert H. and Stout C.D. (1992)

Crystal structures of aconitase with isocitrate and nitroisocitrate bound.

Biochemistry, **31**, 2735-2748

Lawson D.M., Treffy A., Artymiuk P.J., Harrison P.M., Yewdall S.J., Luzzago A., Cesareni G., Levi S. and Arosio P. (1989)

Identification of the Ferroxidase Centre in Ferritin.

FEBS Lett., **254**, 207-210

Lebrón J.A., West A.P. and Bjorkman P.J. (1999)

The Hemochromatosis Protein HFE Competes with Transferrin for Binding to the Transferrin Receptor.

J. Mol. Biol., **294**, 239-245

Leibold E.A. and Munro H.N. (1988)

Cytoplasmic Protein Binds In Vitro to a Highly Conserved Sequence in the 5' Untranslated Region of Ferritin Heavy- and Light-Subunit mRNAs.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **85**, 2171-2175

Leibold E.A., Laudano A. and Yu Y. (1990)

Structural Requirements of Iron-Responsive Elements for Binding of the Protein Involved in Both Transferrin Receptor and Ferritin mRNA Post-Transcriptional Regulation.

Nucl. Acids Res., **18**, 1819-1824

Levi S., Luzzago A., Cesarini G., Cozzi A., Franceschinelli F., Albertini A. and Arosio P. (1988)

Mechanism of Ferritin Iron Uptake: Activity of the H-Chain and Deletion Mapping of the Ferro-Oxidase Site. A Study of Iron Uptake and Ferro-Oxidase Activity of Human Liver, Recombinant H-Chain Ferritins, and of Two H-Chain Deletion Mutants.

J. Biol. Chem., **263**, 18086-18092

Lill R., Diekert K., Kaut A., Lange H., Pelzer W., Prohl C. and Kispal G. (1999)

The Essential Role of Mitochondria in the Biogenesis of Cellular Iron-Sulfur Proteins.

Biol. Chem., **380**, 1157-1166

Lill R. and Kispal G. (2000)

Maturation of Cellular Fe-S Proteins : An Essential Function of Mitochondria.

Trends Biochem. Sci., **25**, 352-356

Lutz M., Moulis J-M and Meyer J. (1983)

Resonance Raman Spectroscopy of *Azotobacter Vinelandii* Ferredoxin I.

FEBS Lett., **163**, 212-216

----- M -----

MacGillivray R.T.A., Moore S.A., Chen J., Anderson B.F., Baker H., Luo Y., Bewley M., Smith C.A., Murphy M.E.P., Wang Y., Mason A.B., Woodworth R.C., Brayer G.D. and Baker E.N. (1998)

Two High-Resolution Crystal Structures of the Recombinant N-Lobe of Human Transferrin Reveal a Structural Change Implicated in Iron Release.

Biochemistry, **37**, 7919-7928

Martinez G.R., Ravanat J-L., Medeiros M.H.G., Cadet J. and Di Mascio P. (2000)

Synthesis of a Naphtalene Endoperoxyde as a Source of ¹⁸O-labeled Singlet Oxygen for Mecanistic Studies.

J. Am. Chem. Soc., **122**, 10212-10213

McCord J.M. and Fridovich I. (1969)

Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein).

J Biol Chem., **244**, 6049-6055

McKie A.T., Marciani P., Rolfs A., Brennan K., Wehr K., Barrow D., Miret S., Bomford A., Peters T.J., Farzaneh F., Hediger M.A., Hentze M.W. and Simpson R.J. (2000)

A Novel Duodenal Iron-Regulated Transporter, IREG1, Implicated in the Basolateral Transfer of Iron to the Circulation.

Mol. Cell, **5**, 299-309

McKie A.T., Barrow D., Lantude-Dada G.O., Rolfs A., Sager G., Mudaly E., Mudaly M., Richardson C., Barlow D., Bomford A., Peters T.J., Raja K.B., Shirali S., Hediger M.A., Farzaneh F. and Simpson R.J. (2001)

An Iron-Regulated Ferric Reductase Associated with the Absorption of Dietary Iron.

Science, **291**, 1755-1759

Meyer J., Gagnon J., Sieker L.C., Van Dorsselaer A. and Moulis J-M. (1990)

Rubredoxin from *Clostridium Thermosaccharolyticum*. Amino Acid Sequence, Mass-Spectrometric and Preliminary Crystallographic Data.

Biochem. J., **271**, 839-841

Mikulits W., Schranzhofer M., Beug H. and Müllner E.W. (1999)

Post-Transcriptional Control Via IronResponsive Elements : The Impact of Aberrations in Hereditary Disease.
Mutat. Res., **437**, 219-230

Minotti G., Recalcati S., Mordente A., Liberi G., Calafiore A. M., Mancuso C., Preziosi P. and Cairo G. (1998)

The Secondary Alcohol Metabolite of Doxorubicin Irreversibly Inactivates Aconitase/Iron Regulatory Protein-1 in Cytosolic Fractions from Human Myocardium.
FASEB J., **12**, 541-551

Minotti G., Cairo G. and Monti E. (1999)

Role of Iron in Anthracycline Cardiotoxicity : New Tunes of an Old Song ?
FASEB J., **13**, 199-212

Moulis J-M and Meyer J. (1982)

Characterization of the Selenium-Substituted 2[4Fe-4Se] Ferredoxin from *Clostridium Pasteurianum*.
Biochemistry, **21**, 4762-4771

Moulis J-M., Scherrer N., Gagnon J., Forest E., Pétillet Y. and Garcia D. (1993)

Primary Structure of *Chromatium Tepidum* High-Potential Iron-Sulfur Protein in Relation to Thermal Denaturation.
Arch. Biochem. Biophys., **305**, 186-192

Muckenthaler M., Gray N.K., Hentze M.W. (1998)

IRP-1 Binding to Ferritin mRNA Prevents the Recruitment of the Small Ribosomal Subunit by the Cap-Binding Complex eIF4F.
Mol. Cell, **2**, 383-388

Mühlenhoff U. and Lill R. (2000)

Biogenesis of Iron-Sulfur Proteins in Eucaryotes : A Novel Task of Mitochondria that is Inherited from Bacteria.
Biochim. Biophys. Acta, **1459**, 370-382

Myers C.E., Gianni L, Simone C.B, Klecker R and Greene R. (1982)

Oxidative Destruction of Erythrocyte Ghost Membranes Catalysed by the Doxorubicin-Iron Complex.
Biochemistry, **21**, 1707-1713

----- N -----

Nakai Y., Nakai M., Hayashi H. and Kagamiyama H (2001)

Nuclear Localization of Yeast Nfs1p is Required for Cell Survival.

J. Biol. Chem., **276**, 8314-8320

Neilands J.B. (1981)

Microbial Iron Compounds.

Annu. Rev. Biochem., **50**, 715-731

Nelson D.P. and Kiesow L.A. (1972)

Enthalpy of Decomposition of Hydrogen Peroxide by Catalase at 25°C (with Molar Extinction Coefficients of H₂O₂ Solutions in the UV).

Anal. Biochem., **49**, 474-478

----- O -----

Oliveira L., Bouton C. and Drapier J-C. (1999)

Thioredoxin Activation of Iron Regulatory Proteins. Redox Regulation of RNA Binding after Exposure to Nitric Oxide.

J. Biol. Chem., **274**, 516-521

----- P -----

Pantopoulos K., Gray N.K. and Hentze M.W. (1995)

Differential Regulation of Two Related RNA-Binding Proteins, Iron Regulatory Protein (IRP) and IRPB.

RNA, **1**, 155-163

Pantopoulos K. and Hentze M.W. (1995)

Rapid Responses to Oxidative Stress Mediated by Iron regulatory Protein.

EMBO J., **14**, 2917-2924

Pantopoulos K., Weiss G. and Hentze M.W. (1996)

Nitric Oxide and Oxidative Stress (H₂O₂) Control Mammalian Iron Metabolism by Different Pathways.

Mol. Cell. Biol., **16**, 3781-3788

Pantopoulos K., Mueller S., Atzberger A., Ansorge W., Stremmel W. and Hentze M.W. (1997)

Differences in the Regulation of Iron Regulatory Protein-1 (IRP-1) by Extra- and Intracellular Oxidative Stress.
J. Biol. Chem., **272**, 9802-9808

Pantopoulos K. and Hentze M.W. (1998)

Activation of Iron Regulatory Protein-1 by Oxydative Stress *in Vitro*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **95**, 10559-10563

Paraskeva E. and Hentze M.W. (1996)

Iron-Sulfur Clusters as Genetic Regulatory Switches : The Bifunctional Iron Regulatory Protein-1.
FEBS Lett., **389**, 40-43

Pétillot Y., Forest E., Meyer J. and Moulis J-M. (1995a)

Observation of holoprotein Molecular Ions of Several Ferredoxins by Electrospray-Ionization-Mass Spectrometry.
Anal. Biochem., **228**, 56-63

Pétillot Y., Golinelli M-P., Forest E. and Meyer J. (1995b)

Electrospray-Ionization Mass Spectrometry of Molecular Variants of a [2Fe-2S] Ferredoxin.
Biochem Biophys Res Commun., **210**, 686-694

Piñero D.J., Hu J., Cook B.M., Scaduto Jr. R.C., Connor J.R. (2000)

Interleukine-1 β Increases Binding of the Iron Regulatory Protein and the Synthesis of Ferritin by Increasing the Labile Iron Pool.
Bioch. Biophys. Acta., **1497**, 279-288

Phillips J.D., Guo B., Yu Y., Brown F.M. and Leibold E.A. (1996)

Expression and biochemical Characterization of Iron Regulatory Protein 1 and 2 in *Saccharomyces cerevisiae*.
Biochem., **35**, 15704-15714

Philpott C.C., Haile D., Rouault T.A. and Klausner R.D. (1993)

Modification of a Free Fe-S Cluster Cysteine Residue in the Active Iron-Responsive Element-Binding Protein Prevents RNA Binding.
J. Biol. Chem., **268**, 17655-17658

Philpott C.C., Klausner R.D. and Rouault T.A. (1994)

The Bifunctional Iron-Responsive Element Binding Protein / Cytosolic Aconitase : The Role of Active-Site Residues in Ligand Binding and Regulation.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **91**, 7321-7325

Ponka P., Beaumont C. and Richardson D.R. (1998)

Function and Regulation of Transferrin and Ferritin.

Semin. Hematol., **35**, 35-54

Pourzand C., Watkin R.D., Brown J.E. and Tyrrel R.M. (1998)

Ultraviolet A Radiation Induces Immediate Release of Iron in Human Primary Skin Fibroblasts : The Role of Ferritin.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **96**, 6751-6756

Puglisi J.D., Tan R., Calnan B.J., Frankel A.D. and Williamson J.R. (1992)

Conformation of the TAR RNA-arginine complex by NMR spectroscopy.

Science, **257**, 76-80

----- R -----

Riedel H.D., Muckenthaler M.U., Gehrke S.G., Mohr I., Brennan K., Hermann T., Fitscher B.A., Hentze M.W. and Stremmel W. (1999)

HFE Downregulates Iron Uptake from Transferrin and Induces Iron-Regulatory Protein Activity in Stably Transfected Cells.

Blood, **94**, 3915-3921

Robbins A.H. and Stout C.D. (1989)

The Structure of Aconitase.

Proteins, **5**, 289-312

Rouault T.A., Hentze M.W., Haile D.J., Harford J.B. and Klausner R.D. (1989)

The Iron-Responsive Element Binding Protein : A method for the Affinity Purification of a Regulatory RNA-Binding Protein.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 5768-5772

Ryter S.W. and Tyrrell R.M. (1998)

Singlet Molecular Oxygen ($^1\text{O}_2$) : A Possible Effector of Eucaryotic Gene Expression.

Free Rad. Biol. Med., **24**, 1-16

----- S -----

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B. and Erlich H.A. (1988)

Primer-directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase.

Science, **239**, 487-491

Samaniego F., Chin J., Iwai K., Rouault T.A. and Klausner R.D. (1994)

Molecular Characterization of a Second Iron-Responsive Element Binding Protein, Iron Regulatory Protein 2. Structure, Function and Post-Transcriptional Regulation.

J. Biol. Chem., **269**, 30904-30910

Schalinske K.L., Anderson S.A., Tuazon P.T., Chen O.S., Kennedy M.C. and Eisenstein R.S. (1997)

The Iron-Sulfur Cluster of Iron Regulatory Protein 1 Modulates the Accessibility of RNA Binding and Phosphorylation Sites.

Biochemistry, **36**, 3950-3958.

Schiestl R.H. and Gietz R.D. (1989)

High Efficiency Transformation of Intact Yeast Cells Using Single Stranded Nucleic Acids as a Carrier.

Curr. Genet., **16**, 339-346

Singal P. K., Li T., Kumar D., Danelisen I. and Iliskovic N. (2000)

Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation.

Mol. Cell. Biochem., **207**, 77-85

Svergun D.I., Barberato C. and Koch M.H.J. (1995)

CRY SOL - A Program to Evaluate X-Ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates.

J. Applied Crystallogr., **28**, 768-773

Svergun D.I., Richard S., Koch M.H.J., Sayers Z., Kuprin S. and Zaccai G. (1998)

Protein Hydration in Solution : Experimental Observation by X-Ray and Neutron Scattering.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95, 2267-2272

Svergun D.I. (1999)

Restoring Low Resolution Structure of Biological Macromolecules from Solution Scattering Using Simulated Annealing.

Biophys. J., 76, 2879-2886

Swenson G.R. and Walden W.E. (1994)

Localisation of an RNA Binding Element of the Iron Responsive Element Binding Protein within a Proteolytic Fragment Containing Iron Coordination Ligands.

Nucleic Acids Res., 22, 2627-2633

----- T -----

Taatjes D.J., Fenick D.J., Gaudiano G. and Koch T.H. (1998)

A Redox Pathway Leading to the Alkylation of Nucleic Acids by Doxorubicin and Related Anthracyclines : Application to the Design of Antitumor Drugs for Resistant Cancer.

Curr. Pharma. Design, 4, 203-218

Tabor S. and Richardson C.C. (1985)

A Bacteriophage T7 RNA Polymerase/Promoter System for Controlled Exclusive Expression of Specific Genes.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 1074-1078

Takanashi E. and Bachur N.R. (1976)

Adriamycin Metabolism in Man. Evidence from Urinary Metabolites.

Drug Metabolism and Disposition, 4, 79-87

Theil E.C. and Eisenstein R.S (2000)

Combinatorial mRNA Regulation : Iron Regulatory Proteins and Iso-Iron-Responsive Elements (Iso-IREs).

J. Biol. Chem., 275, 40659-40662

Thomson A.M., Rogers J.T. and Leedman P.J. (2000)

Thyrotropin-Releasing Hormone and Epidermal Growth Factor Regulate Iro-Regulatory Protein Binding in Pituitary Cells via Protein Kinase C-Dependent and -Independent Signaling Pathways.

J. Biol. Chem., 275, 31609-31615

Tinoco I.Jr., Bustamante C. and Maestre M.F. (1980)

The Optical Activity of Nucleic Acids and their Aggregates.

Ann. Rev. Biophys. Bioeng., **9**, 107-141

Tong W.H. and Rouault T. (2000)

Distinct Iron-Sulfur Cluster Assembly Complexes Exists in the Cytosol and Mitochondria of Human Cells.

EMBO J., **19**, 5692-5700

Toth I. and Bridges K.R. (1995)

Ascorbic Acid Enhances Ferritin mRNA Translation by an IRP/Aconitase Switch.

J. Biol. Chem., **270**, 19540-19544

Trikha J., Theil E.C., and Allewell N.M. (1995)

High Resolution Crystal Structures of Amphibian Red-Cell L Ferritin: Potential Roles for Structural Plasticity and Solvation in Function.

J. Mol. Biol., **248**, 949-967

Tsuji Y., Ayaki H., Whitman S.P., Morrow C.S., Torti S.V. and Torti, F.M. (2000)

Coordinate Transcriptional and Translational Regulation of Ferritin in Response to Oxidative Stress.

Mol. Cell. Biol., **20**, 5818-5827

----- U -----

Uetz P, Giot L, Cagney G, Mansfield T.A., Judson R.S., Knight J.R., Lockshon D., Narayan V., Srinivasan M., Pochart P., Qureshi-Emili A., Li Y., Godwin B., Conover D., Kalbfleisch T., Vijayadamodar G., Yang M., Johnston M., Fields S. and Rothberg J.M. (2000)

A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*.

Nature, **403**, 623-627

----- V -----

Vásquez-Vivar J., Kalyanaraman B. and Kennedy M.C. (2000)

Mitochondrial Aconitase is a Source of Hydroxyl Radical. An Electron Spin Resonance Investigation.

J. Biol. Chem., **275**, 14064-14069

Venyaminov S.Y. and Yang J.T. (1996)

Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules (Fasman, G. D., Ed) pp.69-107, Plenum Press, New York.

Vulpe C.D., Kuo Y-M, Murphy T.L., Cowley L., Askwith C., Libina N., Gitschier J. and Anderson G.J. (1999)

Hephaestin, a Ceruloplasmin Homologue Implicated in Intestinal Iron Transport, is Defective in the *sla* Mouse.
Nature Genetics, **21**, 195-199

----- W -----

Wagstaff M., Worwood M. and Jacobs A. (1978)

Properties of Human Tissue Isoferritins.

Biochem. J., **173**, 969-977

Wardeska J.G., Viglione B. and Chasteen N.D (1986)

Metal Ion Complexes of Apoferritin. Evidence for Initial Binding in the Hydrophilic Channels.

J. Biol. Chem., **261**, 6677-6683

Weiss G., Goossen B., Doppler W., Fuchs D., Pantopoulos K., Werner-Felmayer G., Wachter H. and Hentze M.W. (1993)

Translational regulation via Iron-Responsive Elements by the Nitric Oxide/NO-Synthase Pathway.

EMBO J., **12**, 3651-3657

Woody R.W. (1995)

Circular Dichroism.

Methods Enzymol., **246**, 35-71

----- Y -----

Yoshida T. and Migita C.T. (2000)

Mechanism of Heme Degradation by Heme Oxygenase.

J. Inorg. Biochem., **82**, 33-41

Yu Y., Radisky E. and Leibold E.A (1992)

The Iron-Responsive Element Binding Protein. Purification, Cloning and Regulation in Rat Liver.

J. Biol. Chem., **267**, 19005-19010

----- Z -----

Zaccaï G. and Jacrot B. (1983)

Small Angle Neutron Scattering.

Ann. Rev. Biophys. Bioeng., **12**, 139-157

Zeman S.M., Philips D.R. and Crothers D.M. (1999)

Characterization of Covalent Adiamycin-DNA adducts.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **95**, 11561-11565

Zheng L., Kennedy M.C., Beinert H. and Zalkin H. (1992a)

Mutational Analysis of Active Site Residues in Pig Heart Aconitase.

J. Biol. Chem., **267**, 7895-7903

Zheng L., Kennedy M.C., Blondin G.A., Beinert H. and Zalkin H. (1992b)

Binding of Cytosolic Aconitase to the Iron Responsive Element of Porcine Mitochondrial Aconitase mRNA.

Arch. Biochem. Biophys., **299**, 356-360

Summary

Iron Regulatory Protein 1 (IRP1) is a cytosolic protein that regulates the intracellular iron concentration in metazoans by a post-transcriptional mechanism. It binds specific sequences, called Iron responsive Element (IRE), on the untranslated regions of different mRNA involved in iron homeostasis. When iron is abundant, IRP1 loses its RNA-binding activity, assembles a [4Fe-4S] cluster and becomes an aconitase. The building and destruction of the iron-sulfur cluster is a key feature of the regulation.

The recombinant human IRP1 has been purified as the aconitase [4Fe-4S] form and the reaction of various compounds able to modify the IRP1 activity has been studied. Several reactive oxygen species in small excess over the protein produce the inactive [3Fe-4S] form. The cytostatic drug, doxorubicin, changes IRP1 activity, but its impact depends on the conditions and involves several mechanisms. Large amounts of 2-mercaptoethanol fully convert IRP1 into its IRE-binding form. Ethanol plays a similar role, and these chemicals act as solvents in this process.

IRP1 has been investigated by a two hybrid approach in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. No genuine physiological partners have been discovered. Alternative approaches may be needed toward this aim.

The possibility of measuring IRE binding to IRP1 by a fluorescent assay coupled to capillary electrophoresis has been probed. Our data do not validate the method but they provide indications about how to improve the sensitivity and efficiency to develop it.

Conformational changes between the two active forms of IRP1 have been analyzed by two complementary methods. The building of some secondary structure elements depends on the form of the protein being studied and on the binding of substrates. The hydrodynamic properties also vary between these different states. Without additional structural information on IRP1, these studies give an idea about how IRP1 fulfils its regulatory function.

Keywords

iron, regulation, aconitase, reactive oxygen species, doxorubicin, two hybrid, capillary electrophoresis, neutrons scattering, circular dichroism

Résumé

Iron Regulatory Protein 1 (IRP1) est une protéine cytosolique dont le rôle est de réguler la concentration de fer intracellulaire chez les métazoaires par un mécanisme post-transcriptionnel. Elle interagit avec certains ARN messagers au niveau de motifs spécifiques appelés IRE (*Iron Responsive Element*) situés dans leurs régions non traduites et modifie la synthèse des protéines correspondantes. En présence de fer, IRP1 perd cette capacité de fixation, intègre un agrégat [4Fe-4S] et acquiert une activité aconitase. La régulation s'effectue donc par un processus d'assemblage et de désassemblage du centre fer-soufre.

La réactivité de la protéine recombinante IRP1 humaine, purifiée sous sa forme aconitase [4Fe-4S], a été étudiée vis à vis d'autres effecteurs que le fer capables de modifier l'activité des IRP. Ainsi des excès assez modestes de diverses espèces réactives de l'oxygène ne peuvent former que l'espèce [3Fe-4S] de la protéine. La doxorubicine, un composé cytostatique utilisé comme anti-cancéreux, a une action sur IRP1, mais elle dépend des conditions d'application et implique certainement des mécanismes multiples. *In vitro*, IRP1 est complètement activée pour la fixation d'ARN par un fort excès de 2-mercaptoéthanol. Parmi les diverses causes possibles de cet effet, les propriétés de solvant de ce produit (comme de l'éthanol) en sont responsables.

La recherche d'éventuels partenaires physiologiques de la protéine IRP1 a été entreprise par une étude double hybride chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, mais les constructions utilisées n'ont pas permis de déterminer de candidats potentiels. L'utilisation d'autres constructions ainsi que d'autres systèmes double hybride est envisagée pour la poursuite de cette étude.

Une nouvelle méthode de dosage de l'activité de fixation au motif IRE a été envisagée par l'utilisation d'un substrat fluorescent et de l'électrophorèse capillaire. Les résultats préliminaires obtenus n'ont pas encore abouti, mais ils contribuent à donner des orientations pour le développement de cette méthode présentant de nombreux avantages.

Des changements de conformation entre les deux formes actives de IRP1 ont été analysés par deux méthodes structurales en solution. La formation de certains éléments de structure secondaire d'IRP1 dépend de l'état d'activité de la protéine et ils sont sensibles à la fixation des substrats. Les propriétés hydrodynamiques d'IRP1 varient aussi lors de ces différents changements. Faute de structure à haute résolution, ces informations permettent toutefois de se représenter le comportement structural d'IRP1 dans son rôle de régulateur.

Mots Clés

fer, régulation, aconitase, espèces réactives de l'oxygène, doxorubicine, double hybride, électrophorèse capillaire, diffusion des neutrons, dichroïsme circulaire